

Abstract of WO9710265 (JP11512436)

S-nitrosothiols (RSNOs) can donate the NO group to the beta 93 cysteine residues of hemoglobin (Hb) without inactivating the heme. S-nitrosylation of Hb is under the allosteric control of oxygen and the oxidation state of heme. NO group release from S-nitrosohemoglobin (SNO-Hb) is further facilitated by intracellular low molecular weight thiols, forming RSNOs which can be exported from the erythrocyte to regulate blood pressure and platelet activation. SNO-Hb can be formed by reaction of Hb with S-nitrosothiol. This procedure avoids oxidation of the heme. Other methods can be used which are not specific only for thiol groups, but which nitrosate Hb more extensively, and may produce polynitrosated methHb as a product or intermediate product of the method. SNO-Hb in its various forms and combinations thereof (oxy, deoxy, met; specifically S-nitrosylated, or nitrosated or nitrated to various extents) can be administered to an animal or human where it is desired to oxygenate, to scavenge free radicals, or to release NO⁺ groups to tissues. Thiols and/or NO donating agents can also be administered to enhance the transfer of NO⁺ groups. Examples of conditions to be treated by SNO-Hbs or other nitrosated or nitrated forms of Hb include ischemic injury, hypertension, angina, reperfusion injury and inflammation, and disorders characterized by thrombosis.

THEIR PLACE IS A BANK (1887)

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平11-512436

(43)公表日 平成11年(1999)10月26日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00
31/00	6 0 7	31/00
	6 0 9	6 0 7 C
	6 1 1	6 0 7 A
		6 0 9 F
		6 1 1

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 75 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号	特願平9-512108
(86) (22)出願日	平成8年(1996)9月13日
(85)翻訳文提出日	平成10年(1998)3月14日
(86)国際出願番号	PCT/US96/14659
(87)国際公開番号	WO97/10265
(87)国際公開日	平成9年(1997)3月20日
(31)優先権主張番号	60/003, 801
(32)優先日	1995年9月15日
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	08/616, 371
(32)優先日	1996年3月15日
(33)優先権主張国	米国(US)

(71)出願人	デューク ユニバーシティ メディカル センター
	アメリカ合衆国 ノースキャロライナ 27710 ダラム, アーウィン ロード (番 地なし)
(72)発明者	スタンラー, ジョナサン エス. アメリカ合衆国 ノースキャロライナ 27514 チャペルヒル, ジュニパー ブレ イス 3416
(74)代理人	弁理士 細田 芳徳

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 ニトロソ化ヘモグロビンおよびその治療上の使用

(57)【要約】

S-ニトロソチオール (RNSO) は、ヘムを不活性化することなく、ヘモグロビン (Hb) の β 93 システイン残基に NO 基を供与しうる。Hb の S-ニトロシル化は、酸素およびヘムの酸化状態のアロステリックコントロール下にある。S-ニトロソヘモグロビン (SNO-Hb) からの NO 基放出は、細胞内の低分子量のチオールによってさらに促進され、RNSO を生成し、RNSO は赤血球から輸送されて血圧および血小板活性化を制御することができる。SNO-Hb は、Hb の S-ニトロソチオールとの反応によって生成され得る。この方法は、ヘムの酸化を回避する。チオール基のみに特異的ではなく、Hb をより多くニトロソ化する他の方法を用いてもよく、該方法は、該方法の生成物または中間生成物としてポリニトロ化メトHb を製造してもよい。様々な型の SNO-Hb およびそれらの組み合わせ (オキシ、デオキシ、メト; 特に、S-ニトロシル、または様々な程度のニトロソ化もしくはニトロ化) は、酸素化し、フリーラジカルを捕捉し、組織に NO⁺ 基を放出することが望ましい動物またはヒトに投与され得る。ま

た、チオールおよび/またはNO供与剤を投与して、NO⁺ 基の転移を充進することができる。SNO-Hb または他のニトロソ化型もしくはニトロ型の Hb によって治療する状態の具体例としては、虚血損傷、高血圧、アンギナ、再灌流損傷および炎症、ならびに血栓症によって特徴付けられる障害があげられる。

【特許請求の範囲】

1. 低分子量のニトロソ化剤を哺乳類に投与する工程を含む、哺乳類の細胞へのNOの送達方法。
2. 低分子量のNO供与剤を哺乳類に投与する工程を含む、哺乳類のヘモグロビンのO₂送達能の増強方法。
3. 低分子量のニトロソ化剤を哺乳類に投与する工程を含む、哺乳類の酸素フリーラジカルの捕捉方法。
4. ニトロソ化ヘモグロビンおよび低分子量のチオールまたはNO供与剤を含有してなる組成物で器官を灌流する工程を含む、生存器官のエックス・ピボ(ex vivo)の保存方法。
5. 下記工程：
 - a) 患者の赤血球を単離する工程；
 - b) 該患者の赤血球をS-ニトロソチオールで処理する工程；および
 - c) 該赤血球を該患者に再投与する工程を含む、患者の血液で生じる疾患(blood borne disease)の治療方法。
6. 血液で生じる疾患がマラリアである、請求項5記載の方法。
7. ニトロソ化剤を哺乳類に投与する工程を含む、哺乳類の疾患または医学的障害の治療方法。
8. ニトロソ化剤が標的細胞に迅速に入るよう選ばれる請求項7記載の方法。
9. 該疾患または医学的障害がショック、アンギナ、発作、再灌流損傷、急性肺損傷、鎌状赤血球貧血および赤血球の感染からなる群より選ばれる請求項7記載の方法。
10. ヘムFeの検出可能な酸化なしでS-ニトロシル化されたSNO-Hb〔Fe II〕O₂を含有してなる組成物。
 11. 酸素の存在下で過剰のニトロソ化剤を精製ヘモグロビンとインキュベートする工程を含む、チオール基で特異的にS-ニトロシル化されたSNO-Hb〔Fe II〕O₂の製造方法。
 12. ニトロソ化剤が低分子量のS-ニトロソチオールである請求項11記載の

方法。

13. ヘムFeの検出可能な酸化なしでS-ニトロシル化されたSNO-Hb〔FeII〕を含有してなる組成物。

14. 酸素の非存在下で過剰のニトロソ化剤を精製ヘモグロビンとインキュベートする工程を含む、チオール基で特異的にS-ニトロシル化されたSNO-Hb〔FeII〕の製造方法。

15. ニトロソ化剤が低分子量のS-ニトロソチオールである請求項14記載の方法。

16. ヘム鉄の酸化状態および酸素化状態に対して選ばれた、低分子量のチオールまたはニトロソチオールおよびヘモグロビンまたはニトロソ化ヘモグロビンの混合物を哺乳類に投与する工程を含む、哺乳類における、様々な酸化還元型の、酸素およびNOの送達の制御方法。

17. ニトロソ化ヘモグロビンを含有してなる代用血液を哺乳類に投与する工程を含む、哺乳類におけるNOの送達方法。

18. 代用血液がニトロソ化ヘモグロビンおよび低分子量のS-ニトロソチオールを含有してなる、請求項17記載の方法。

19. ニトロソ化ヘモグロビンを含有してなる代用血液を哺乳類に投与する工程を含む、哺乳類における酸素フリーラジカルおよびNO⁺の捕捉方法。

20. ニトロソ化ヘモグロビンを哺乳類に投与する工程を含む、哺乳類における血圧の低下方法。

21. 疾患が心臓疾患、脳疾患、血管疾患、アテローム性動脈硬化症、肺疾患、および炎症からなる群より選ばれる、ニトロソ化型またはニトロ化型のヘモグロビンを哺乳類に投与する工程を含む哺乳類の疾患の治療方法。

22. 医学的状態が発作、アンギナおよび急性呼吸困難からなる群より選ばれる、ニトロソ化型のヘモグロビンを哺乳類に投与する工程を含む哺乳類の医学的状態の治療方法。

23. SNO-Hb〔FeII〕O₂を含有してなる溶液に器官を保存する工程を

含む、切り取った器官の保存を向上させる方法。

24. SNO-Hb [Fe II] O₂を含有してなる調製物をヒトに投与する工程
を含む、鎌状赤血球貧血を有するヒトの治療方法。

25. 該調製物がSNO-Hb [Fe II] O₂およびチオールを含有してなる請
求項24記載の方法。

26. 該調製物がSNO-Hb [Fe II] O₂およびS-ニトロソチオールを含
有してなる請求項24記載の方法。

27. ニトロソ化ヘモグロビンを含有してなる有効量の調製物を患者に投与する
工程を含む、一酸化窒素代謝および酸素代謝の異常により特徴付けられる疾患ま
たは医学的状態を有する患者の治療方法。

28. 該疾患または医学的状態が心臓疾患、肺疾患、鎌状赤血球貧血、発作、敗
血症または臓器移植からなる群より選ばれる請求項27記載の方法。

29. ニトロソ化ヘモグロビンまたはニトロ化ヘモグロビンを含有してなる代用
血液。

30. ニトロソ化ヘモグロビンまたはニトロ化ヘモグロビンを含有してなる組成
物の治療上有効量を投与する工程を含む、動物またはヒトにおける血小板活性化
または血小板粘着から生じる障害の治療方法。

31. 該障害が心筋梗塞、肺血栓塞栓症、大脳血栓塞栓症、血栓静脈炎、敗血症
および不安定アンギナからなる群より選ばれる請求項30記載の方法。

32. ニトロソ化ヘモグロビンを含有してなる組成物の治療上有効量を投与する
工程を含む、動物またはヒトにおける血栓形成の阻止方法。

33. ヘモグロビンのアロステリック平衡またはスピニ状態をコントロールする
物質を含有してなる組成物を、治療上有効量で投与する工程を含む、動物または
ヒトにおける血小板活性化の制御方法。

34. 該物質がヘモグロビンのアロステリック状態をR構造からT構造へ変換す
る請求項33記載の方法。

35. 水溶液中でヘモグロビンをヘモグロビン四量体に対して過剰のS-ニトロ
ソチオールと混合し(combining)、得られた混合物(combination)をニトロソ化が

ヘモグロビン上の複数の部位で起きるのに適した条件下で維持する工程を含む、

ポリニトロソ化ヘモグロビンの生成方法。

36. ヘモグロビンをNO供与化合物と混合し、得られた混合物をニトロソ化またはニトロ化が起きるのに適した条件下で維持し、それによってポリニトロソ化ヘモグロビンまたはポリニトロ化ヘモグロビンを生成し、選択的にFe IIIをFe IIに還元する試薬と該ポリニトロソ化ヘモグロビンまたはポリニトロ化ヘモグロビンを反応させる工程を含む、ヘムFeがFe II状態であるポリニトロソ化ヘモグロビンまたはポリニトロ化ヘモグロビンの生成方法。

37. 選択的にFe IIIをFe IIに還元する試薬がシアノボロヒドリドである請求

項36記載の方法。

38. 選択的にFe IIIをFe IIに還元する試薬がメトヘモグロビンリダクターゼである請求項36記載の方法。

39. ポリニトロソ化ヘモグロビンを含有してなる組成物。

【発明の詳細な説明】

ニトロソ化ヘモグロビンおよびその治療上の使用関連出願

本出願は、米国特許出願第60/003,801号に対して優先権を主張する
1996年3月15日に出願された米国特許出願第08/616,371号の一
部継続出願である1996年6月20日に出願された米国特許出願第08/66
7,003号に対して優先権を主張し、これらの出願の教示は、その全体が参照
によって合体される。

発明の背景

ヘモグロビン (Hb) とO₂、CO₂、NOなどといった小さな拡散性リガンドとの相
互作用はその金属中心とアミノ末端で起こることが知られている。肺と全身の微
小脈管構造で起こるO₂/CO₂送達機能はアロステリックに制御される。環境に対する
そのような反応が、NOの場合にもあてはまることは知られていない。具体的に
述べると、Hb (Fe) はNOの作用範囲の制限に関与するが (Lancaster J.R., Proc
. Natl. Acad. Sci. USA, 91:8137-8141 (1994) ; WoodおよびGarthwaite, J. N
europarmacol., 33:1235-1244 (1994))、NOはHbの機能性を生理学的に有意なほ
どには変更しないと考えられている。しかし、この仮定に基づく速度論的モデル
研究によれば、脈管構造中の遊離NOの大半はHbによって捕捉されるはずである (Lancaster 1994)。したがって、仮に平静な器官ではそうでないとしても、アテ
ローム性動脈硬化症に認められるような酸化剤ストレス (oxidant stress) が加
われば、NOの定常状態レベルはグアニル酸シクラーゼなどの標的酵素に対するK_m
よりも低くなるだろう (Lancaster 1994)。これらの考察は、NOがどのようにし
てその生理活性を発揮するのかという根本的な疑問を生じさせる。

このパラドックスに対する1つの回答は、一酸化窒素が、NO様の血管弛緩因子
活性を持つが (Stamler, J.S. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:444-448 (1992))、高濃度の血中Hbによる拡散的制約を受けないS-ニトロソチオール (RS
NO) 生成傾向に見出すことができる (Gaston, B. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. US
A, 90:10957-10961 (1993))。具体的に述べると、RSNOのNO基は、NOそのものとは

異なるニトソニウム (NO[•]) 性を持つ。NOがなしえない一定の機能を引き出す能力をRSNOが持っていることは、ますます理解されつつある (DeGroote, M.A. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:6399-6403 (1995) ; Stamler, J. S., Cell, 78:931-936 (1994))。また、タンパク質中の-SNO基が、おそらくはリン酸化と同様のシグナル伝達機能を果たすという可能性も考慮されている (Stamler, J.S. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:444-448 (1992) ; Stamler, J.S., Cell, 78:931-926 (1994))。タンパク質のS-ニトロシル化はタンパク質機能を調節することができるが (Stamler, J.S. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:444-448 (1992) ; Stamler, J.S., Cell, 78:931-936 (1994))、細胞内でのS-ニトロソタンパク質の同定（調節的翻訳後修飾の必須条件）は、これまでのところ実証されていない。

ヘモグロビンは2つのアルファサブユニットと2つのベータサブユニットからなる四量体である。ヒトHbでは、各サブユニットが1つのヘムを含有し、ベータ(β)サブユニットは反応性の高いSH基 (cys β93) をも含有する (Olson, J.S., Meth. in Enzymology, 76:631-651 (1981) ; Antonini, E. および Brunori, M. Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands (American Elsevier Publishing Co., Inc., ニューヨーク) の29~31頁 (1971))。これらのシステイン残基は、その機能はまだ不明であるが、種間で高度に保存されている。

NO (一酸化窒素) は、数ある機能の中でも特に血圧を下げ血小板機能を阻害する生物学的「伝達分子」である。NOは内皮から血管平滑筋および血小板へ自由に拡散し、神経単位のシナプスを横切って生理的反応を引き起こす。条件によっては、NOと細胞および血清中に存在する他の成分との反応によって、毒性の中間体

と産物が、感染性生物の増殖を阻害するのに有効な組織内局所濃度で生成しうる。したがって、NO又はその生理活性型の有効濃度を投与する方法は、ある種の医学的障害に有益であろうと考えることができる。

血小板活性化は、血液凝固および血栓症素因の本質的な要素である。また、血小板の活性化は、局所的な血栓症が痛みを伴う発症の中核であると考えられる錫状赤血球症などの血液異常において見られる。したがって、血小板凝集の阻害は

、心臓発作、鼓動、末梢血管疾患およびショック（転移血管内凝集）における重要な治療目標である。研究者らは、前記疾患段階の全てにおける酸素送達を促進するために人工ヘモグロビンを与える試みをなしている。しかしながら、最近オルソン（Olson）および共同研究者らによって指摘されたように、非誘導ヘモグロビンの投与は、血管損傷部位での血小板活性化を導く（オルソン、S. B. (Olson, S. B.) ら、*Circulation* 93:327-332 (1996)）。この主要な問題は、専門家を、無細胞非誘導ヘモグロビンが血管疾患または凝固異常を有する患者における重大な危険を提起すると結論する方向に導いている（マーカス、A. J. (Marcus, A. J.) およびJ. B. ブロークマン (J. B. Broekman)、*Circulation* 93: 208-209 (1996)）。新規な酸素キャリアーの提供方法および／または血小板活性化の阻害方法は、血管疾患を有する患者またはさもなければ血栓症の危険のある患者に利益があるであろう。

発明の概要

本発明は、ヘムの酸化を回避する方法におけるHbとS-ニトロソチオールとの反応による、SNO-Hbの生成方法に関する。また、本発明は、該方法の工程に依存して、ヘムのFeが酸化されてもよく、または酸化されなくてもよいヘモグロビンのニトロソ化誘導体（チオールまたは金属でのニトロシル化を含む）およびニトロ化誘導体の製造方法を含む。また、本発明は、酸素を送り込むこと、遊離ラジカルを捕捉すること、または組織にNO⁺を放出することが望ましい

状態に対する治療方法に関する。その様々な型およびその組合せのSNO-Hb（オキシ、デオキシ、メト、具体的にはS-ニトロシル化、または様々な程度でのニトロソ化もしくはニトロ化）は、これらの方法において動物またはヒトに投与し得る。また、チオールおよび／またはNO供与剤を投与して、NO⁺基の転移を促進することができる。ヘモグロビンのニトロソ化型もしくはニトロ化型による処置対象の状態の具体例としては、虚血損傷、高血圧、アンギナ、再灌流損傷および炎症ならびに血栓症によって特徴付けられる疾患などがあげられる。

図面の簡単な説明

図1A～1Dは、実施例1に記載の異なる型のHbの分光グラフである。

図2Aは、S-ニトロシル化によるSNO-Hbの生成を経時的に示すグラフである。

図2Bは、オキシ型およびデオキシ型SNO-Hbの分解を経時的に示すグラフである

図3Aは、赤血球に対するS-ニトロソシスティンの負荷を経時的に示すグラフ

である。挿入図は、実施例3に記載するHbの形態の一連の分光グラフである。

図3Bは、ウサギ大動脈環を実施例3に記載の種々の薬剤で処理した後に、その

大動脈環の等尺性緊張 (isometric tone) を記録した一連の軌跡である。

図4Aは、実験に使用したHbの濃度に対するウサギ大動脈環の張力の変化を表わすグラフである。

図4Bは、実験に使用したHbの濃度に対するウサギ大動脈環の張力の変化を表わすグラフであり、ここでは、グルタチオンをも加えて、その効果を図4Aと比較検討した。

図4Cは、時間に対する生成S-ニトロソグルタチオン/出発SNO-Hb濃度の比を表わすグラフであり、オキシ型およびメト型HbからグルタチオンへのNO基転移の速度を示している。

図4Dは、負荷赤血球から輸出されたS-ニトロソチオール種の経時変化を表わすグラフである。

図5は、様々な用量のオキシHb (▲)、SNO-オキシHb (■) またはSNO-メトHb (●) を与えた後のラットの平均動脈血圧を示すグラフである。

図6A～6Fは、麻酔した犬にS-ニトロソヘモグロビンを投与した後の、血圧 (図6Aおよび6B)、冠状動脈直径 (図6Cおよび6D) および冠状動脈流量 (図6Eおよび6F) を記録した一連の軌跡である。

図7Aは、血小板凝集における非修飾Hb A₀の効果を図示したグラフである。血小板の凝集の最大の範囲は、血小板とプレインキュベートされたHb A (10 nM～100 μM) の濃度に対してプロットされている。実験は、実施例9のように行なわれた。各データポイントでプロットされた垂直の棒は、標準偏差を示している。

図7Bは、血小板凝集におけるS-ニトロソ (オキシ) ヘモグロビンの効果を

図示したグラフである。血小板の凝集の正規化した最大の範囲は、血小板とブレインキュベートされたHbA (10 nM~100 μM) の濃度に対してプロットされている。

図7Cは、S-ニトロソ(メト)ヘモグロビンによる血小板の抗凝集効果を図示したグラフである。

図8は、実施例10でアッセイされた、10⁸個の血小板と相互作用する1、10および100 μM濃度の天然Hb、SNO-オキシHbまたはSNO-メトHbに対するcGMP (グアノシン3'、5' -サイクリックリン酸) の量を示す棒グラフである。

図9Aは、実施例11記載のように処置されたHbA₀のスペクトル（吸光度対ナノメーターでの波長）を示すグラフである。スペクトルAと比較したスペクトルBの最大吸光度の波長におけるシフトは、HbA₀へのNO基の付加の程度を図示する。

図9Bは、実施例11記載の100倍過剰のS-ニトロソグルタチオンで処置されたHbのスペクトルを示すグラフである。

図9Cは、実施例11記載の過剰のS-ニトロソシスティンで処置されたHbA₀のスペクトルを示すグラフである。

図9Dは、100倍過剰のS-ニトロソシスティンで処置されたラットHbのスペクトルを示すグラフである。スペクトルAは、さらに亜ジチオン酸塩で処理されなかったニトロソ化Hbを示す；スペクトルBは、さらに亜ジチオン酸塩で処理されたニトロソ化Hbを示す。

図9Eは、100倍過剰のS-ニトロソシスティン（上の曲線）または10倍過剰のS-ニトロソシスティン（真ん中の曲線）のいずれかとHbA₀を反応させることによる、時間とニトロソ化Hb産物の増加とを図示したグラフである。HbA₀を、100 μMのイノシトールヘキサホスフェートとブレインキュベートしたのちに、10倍過剰のS-ニトロソシスティンと反応させた（下の曲線、三角形のポイント）（実施例11参照）。

図10は、○：100 nmol/kg SNO-Hb、●：1000 nmol

/kg SNO-Hb、または■：1000 nmol/kg 非誘導Hbでのラットの注射ののちのラットの尾状核被殻において測定された血液流における、時間とパーセンテージの変化とを図示したグラフである（実施例12参照）。

図11は、試験されたヘモグロビンのモル濃度の対数の関数としてプロットされた、ウサギ由来の大動脈環の張力におけるパーセンテージの変化を図示したグラフである（実施例13参照）。●：CYSNO/Hbが1:1の比でS-ニトロソシステインで処置されたHb、○：CYSNO/Hbが10:1の比でCYSNOで処置されたHb、◆：100:1の比でCYSNOで処置されたHb。

発明の詳細な説明

生理学に関するヘモグロビンの役割

肺循環路（右心室インポート（import）－左心室）を横切って起こる赤血球のSNO-Hb含量の増大は、Hb分子が肺でS-ニトロシル化されることを示唆している。肺（Gastonら、(1993)）と血液（Scharfstein, J. S. ら, J. Clin. Invest. 94:1432-1439(1995)）に認められる内因性RSNOからHbのSH基へのNO基の選択的転移は、これらの発見を実証するものである。それにもかかわらず、生体内で機能するS-ニトロシル化の機構はわかっていない。肺床を横切って起こるHb（FeII）NOレベルの対応する減少は、NOの除去またはヘムからcys β 93への分子内転移に関する肺の役割を示す。総合すると、これらのデータは、COとCO₂の排出およびO₂の取り込みを含むことが既に知られている呼吸器系内の小分子とHbとの機能調節的相互作用のリストを拡大することになる。Hbの酸素化は、cys β 93のNOに関連する反応性を増大させる構造変化をもたらすので、O₂はHb-S-ニトロシル化のアロステリックエフェクターであると見なすことができる。これは、このタンパク質に関して新たに発見されたアロステリック機能である。

SNO-Hb濃度の動脈- 静脈差は、このタンパク質が全身循環系でNO基供与体として作用することを示唆している。SNO-Hbが血管運動の緊張状態（vasomotor tone）を調節する機能を果たすことは十分に示されている。血圧の制御が行われる微小循環系では、赤血球が内皮表面と緊密に接触する。これらの条件下で、Hbは血管構造に作用して、遊離NOの定常状態レベルを急激に減少させることにより動脈

抵抗が増大しやすい状態にすることができる (Lancaster, J. R., (1994))。この原理は、無細胞Hbを点滴した時に起こる血圧の上昇に寄与すると考えられる (Vogel, W.M. ら, Am. J. Physiol., 251:H413-420(1986); Olsen, S.B. ら, Circulation 93:329-332 (1996))。しかし、このような一過性の高血圧応答は、それに続いてSNO-Hbが生成し、それがこの効果を打ち消すこと（これは天然に存在する濃度における血圧の低下によって証明される）と一致するだろう。したがって、SNO-Hbの合成と代謝を支持するという赤血球の能力は、正常な血流にとって重要だと言えるだろう。

この方向の推論から、哺乳動物は微小循環系で十分なNO送達を確保するためにユニークな分子機構を採用したはずだと考えられる。本発明中の結果は、Hbが、NOホメオスタシスを達成するために、電子的切替え機構とコンフォメーション的切替機構の両方を発展させたことを示唆している。具体的に述べると、SNO-Hb (FeII) O₂の金属中心によるNO捕捉は、そのメト (FeIII)への変換によって感知されるだろう (図1B)。この電子的事象は、NO基の放出を伴うSNO-Hbの分解をもたらすだろう (図3A, 3B, 4A)。このようにして、SNO-HbのNO関連活性は、捕捉されたNOの量によって部分的に決定されるだろう。NOの放出が脱酸素化によって促進されることが観察されたので、O₂圧の変化はNOの送達を調節する機能をもたらすのかもしれない。このアロステリック効果は、組織のO₂不足を制限するよう働くのかもしれない。このモデルによれば、NO基の放出は毛細管血流を調節してO₂送達が増大するように作用するだろう。

タンパク質中のS-ニトロソチオール基は、NOの代謝および細胞機能の調節と関連付けられている (Stamler, J.S. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:444-448 (1992) ; Stamler, J.S., Cell, 78:931-936(1994))。赤血球中のSNO-Hbの同定は、細胞内S-ニトロソタンパク質の最初の証明であり、細胞調節に関するかかる蛋白質の役割をさらに確信させるものである。放出された遊離のNOがHb自身によって即座に捕捉される場合 (Lancaster, J.R., (1994))、SNO-Hbがどのようにして血管を弛緩させるのかという疑問が生じる。これについては、RSNO活性がチオール受容体へのニトロシル (NO⁺) 転移を伴う（これはNO関連活性を金

属中心での不活性から保護する機能を果たす) ことを示す研究(Scharfstein, J. S. ら, (1994); Arnelle, D. R. およびStamler, J.S., Arch. Biochem. Biophys. 318:279-285 (1995) ; Stamler, J.S. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 7674-7677(1992))が注目に値する。本明細書に示した発見は、グルタチオンとのS-ニトロソチオール/チオール交換 (GSNOが生成する) が赤血球内で起こるらしいこと、そしてそれがヘムの酸化状態とリガンドによるその占有によって左

右されるらしいことを示している。デグルート (DeGroote) とその共同研究者らは、GSNOが細菌で一定の活性を発揮するには、無傷のジペプチド (すなわちS-ニトロソシスティニルグリシン) がその細胞膜を横切って輸送される必要があることを示した (DeGroote, M.A. ら, (1995))。本明細書に示すデータは、この枠組みを、真核細胞をも含むように広げるものである。EDRFによるカリウムチャネルのチオール依存的活性化が報告されていることから (Bolotina, V.M. ら, Nature, 368:850-853(1994))、赤血球によって輸出されるGSNOや関連するチオール運搬体 (Kondo, T. ら、Methods in Enzymology, Packer, L. 編, Academic Press, 252:72-83(1995)) も、原形質膜内または原形質膜でシグナル伝達を起こすのかもしれない (Stamler, J.S., Cell, 78:931-936(1994))。もう1つの可能性も考慮する価値がある。すなわち、Hbがcys β 93を介して赤血球膜と会合するという報告 (Salhany, J. M. およびGaines, K. C., Trends in Biochem. Sci., 1月, 13~15(1981)) は、接触している内皮表面に対して、おそらくはSNO/SH交換によって、NO基を直接供与するような位置に、Hbを置くことになるだろう。他のS-ニトロタンパク質によって媒介されるシグナル伝達では、細胞表面相互作用が機能しているようである (Stamler, J.S. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U SA, 89:444-448 (1992) ; Stamler, J.S., Cell, 78:931-936(1994))。

高度に保存されたHbのcys β 93残基は、金属中心の酸素化と酸化傾向に影響を及ぼすことが示されており、またこのタンパク質の物理化学的性質にも影響することが示されている (Garel, C. ら, Biochem. 123:513-519(1982) ; Jocelyn, P. C., ら, Biochemistry of the SH Group, 243頁, Academic Press, London; (1972); Craescu, C.T., J. Biol. Chem. 261:14710-14716(1986); Mansouri, A.,

Biochem. Biophys. Res. Commun., 89:441-447(1979))。それにもかかわらず、長年探求されてきたそれらの生理学的機能はまだ謎のままである。本明細書に記載の研究は、cys β 93がNO関連シグナルを血管壁に伝達する機能を果たすという、Hbの新しい感知および調節機能を示唆している。具体的に述べると、すべて

ての哺乳類と鳥類に共通するcys β 93の生理学的機能は、アロステリック制御の下に、ヘムによって捕捉され得ないNO関連生理活性を送達することである。したがって、これらのデータは、赤血球内Hbがその回路の微環境によってシンク（吸収体）としてもドナー（供与体）としても参加する、NO基の動的回路を明らかにするものである。このような観察結果は、遊離NOの拡散的な分布と反応のみに基づく概念的骨格 (Lancaster, J.R., (1994); WoodおよびGarthwaite, (1994)) から生じるパラドックスに解答を与える。またこれは、一酸化窒素シンターゼやグアニル酸シクラーゼなどの他のチオールおよび金属含有（ヘム）タンパク質にも及ぶ意味を包含し得る。

本明細書に報告する発見は、直接的な治療的意味を持ちうる。すなわち、血中Hbによる不活化ゆえのNO関連活性の喪失に関する懸念 (Lancaster, J.R., (1994)) は、アロステリック制御を受けるRSNOの存在によって回避される。SNO-Hbは、金属中心におけるNO捕捉がもたらす無細胞Hb調製品の有害な高血圧特性を持たない。SNO-Hbを含有することによって血液を模倣する無細胞Hb溶液は、代用血液として使用することができる。

その他の態様

本発明の主題は、ニトロソ化剤を細胞に負荷する方法に関し、これを赤血球に関して図3Aに例示するが、本発明の方法は、より普遍的な方法で行なうことができる。好適なインキュベーションのpH条件とインキュベーションの温度条件は、例えばpH範囲7～9 (pH 8が好ましい)、温度範囲25～37°Cである。赤血球については、S-ニトロシル型Hbの生成を制限するために、1～3分の短いインキュベーション時間が好ましい。しかし、ニトロソ化剤の細胞内濃度は1 mMに達しうる。

ニトロソ化剤はNO⁺の良好な供与体であり、かつ、標的とする細胞タイプの細

胞膜を通過して拡散しうるべきである。すなわち、S-ニトロソタンパク質とは

対照的に低分子量でなければならない。S-ニトロソ-N-アセチルシステイン、S-ニトロソシステイニルグリシン、S-ニトロソシステイン、S-ニトロソホモシステイン、有機硝酸、有機亜硝酸、金属ニトロシル錯体その他、Methods in Nitric Oxide Research (Freelisch, M. およびStamler, J.S. 編; Wiley, 英国チチェスター (1996)) の71~119 頁「Donors of Nitrogen Oxides」(この章の内容はすべて参考により本明細書に合体される) に定義されるニトロソ化剤がその例である。ニトロソ化剤は金属含有タンパク質上の異なる反応基に対して異なる活性を持つ。ニトロソ化剤は、Mbのヘム鉄の酸化が最小となり、システイン上に認められるようなチオール基をニトロシル化する活性が最大となるように選択することができる。

これらの低分子量ニトロソ化剤を赤血球中で使用することにより、NO関連活性を組織に送達することができる。さらに、ニトロソ化剤による赤血球の処理は、赤血球のO₂送達能を増大させるのにも役立つ。また、このような赤血球の処理により、循環系中で酸素フリーラジカルを捕捉することも見込まれる。したがって、例えば（赤血球を単離する最小限の方法として）患者から全血を採取した後、その患者の体外での操作によって赤血球にS-ニトロソロチオールを負荷し、該赤血球を同じ患者に再導入することができ、それにより、組織の異常なO₂代謝、酸素関連毒性、異常な血管緊張、異常な赤血球接着、または赤血球による異常なO₂送達を特徴とするようないくつかのタイプの疾患および医学的障害を治療することができる。かかる疾患には、虚血性損傷、高血圧症、ショック、アンギナ、発作、再灌流損傷、急性肺損傷、鎌状赤血球貧血、住血吸虫症、マラリアなどがあるが、これらに限るわけではない。かかる「負荷」赤血球の使用は、例えば代用血液療法や、移植用器官などの生きた器官の保存にも及ぶ。場合によっては、別人に由来する負荷赤血球で患者を処置することが適当なこともあるだろう。

本明細書では、この処置法の作用機序の具体例として、鎌状赤血球貧血を考察する。鎌状赤血球患者は、急性胸部症候群や肝機能不全などの臨床的症候群とし

て顕在化する血管閉塞性クリーゼをしばしば起こす。凝血体质をもたらす内皮細胞機能不全と赤血球に内在する機能不全は共に、主要な病因である。分子レベルでは、VCAMのような血管接着分子の発現が増大して、異常なヘモグロビンを含有する錐状赤血球の接着を促進する。したがって、内皮細胞でのサイトカイン発現を減じ、内皮機能を増進し、赤血球の錐状化を減衰させることが、主要な治療目的となる。しかし、現在用いられている治療法は概して不成功に終わっている。

赤血球に細胞内NO供与体S-ニトロソチオール類を負荷するこの新規方法には、酸素親和力を増大させ（これはそれ自体またそれだけで赤血球の錐状化を減衰させるはずである）、赤血球に血管拡張活性と抗血小板活性（これらは血管閉塞性クリーゼを反転させるはずである）を与えるという効果がある。さらに、一酸化窒素は、内皮細胞表面での接着分子の発現を減じることにより、内皮機能を回復させるはずである。

本明細書には、S-ニトロソチオール類その他のニトロソ化剤を赤血球に負荷することを伴う錐状赤血球病の治療の新規治療法の手掛かりを記述する。2例の治療法を挙げる。第1の治療法では、患者自身の赤血球を体外でS-ニトロシル化し（これにより「負荷」赤血球を得る）、次いでその患者に与える。第2の方は、赤血球に浸透できるS-ニトロソシスティンのような薬剤を患者に直接投与することである。

いくつかの疾患または障害には、NO負荷赤血球の投与が特に望ましい。酸素化状態から脱酸素化状態に変化すると、あるいはヘム鉄の酸化状態が還元された状態(FeII)から酸化された(FeIII)状態に変化すると、NOがヘモグロビンのチオール基から放出され、それが速やかにグルタチオンに転移して、S-ニトロソグルタチオンが生成する。赤血球は高濃度のグルタチオンを含むことが知られており。S-ニトロソグルタチオンはNOを効率よく組織に送達する。

もう1つの側面として、本発明は、薬剤の標的となる細胞内でチオール基のS-ニトロシル化を引き起こす薬剤を、感染した哺乳動物に投与することによる、感染症の治療法でもある。例えば、リンパ球への浸透性が高いS-ニトロソチオールを、HIVに感染した患者に投与することができる。HIVに対するこのような

処置は、患者から単離した血液に対して生体外で用いることもできる。もう1つの応用では、感染が細菌感染であり、抗細菌剤として使用するS-ニトロソチオールは、宿主細胞への浸透性と比較して、標的細菌細胞への浸透性が非常に高いものである（例えばDeGroote, M.A.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6399-6403 (1995) を参照のこと）。別法として、ニトロソチオール類を赤血球内の熱帶熱マラリア原虫の処理に使用することもできる。

本発明のもう1つの態様は、1以上の金属原子を含有するタンパク質を、その金属の酸化状態を変えたり、その金属原子にNOを結合させるなどの修飾をその金属に加えることなく、そのタンパク質が1以上のチオール基でS-ニトロシル化されるように、特異的に修飾する方法である。これは、金属に結合したタンパク質のチオール基と特異的に反応するニトロソチオール類のようなNO⁺特性を持つ試薬（例えば実施例4A参照）を使用することによって達成できる。

ヘモグロビンの場合、このニトロソ化法はそのヘムに作用しない。SNO-Hb (SN0-Hb (FeII) O₂) は、四量体あたり2つまでのSNO基とHb (FeII) O₂から、ヘムFeをFeIIからFeIIIに酸化することなく合成することができる。これに対し、Hb (FeII) O₂を過剰の一酸化窒素または亜硝酸塩と共にインキュベートすると、メトヘモグロビン (HbFe [III]) が迅速（実施例1B）かつ有意な程度に生成する。Hb [FeII] を一酸化窒素と共にインキュベートすると、NOがヘムにすばやく結合し、Hb (FeII) NOが有意な程度に生成する（実施例1A）。

Hb (FeII) O₂からSNO-Hb (FeII) O₂が生成する速度はさらに速いが（実施例2A参照）、例えば実施例1CのようにS-ニトロソグルタチオンやS-ニトロソシステインをHb (FeII)と共にインキュベートしてSNO-Hb (FeII)を得るなどにより、対応するSNO-デオキシHb型を得ることもできる。

血管拡張に対する種々の形態のHbの効果（収縮効果、拡張効果または中性効果）は、次の3つの要因に依存する：1) ヘムのFeが酸化されているかどうか、2) ヘムにO₂が結合しているかどうか（すなわち、タンパク質のコンフォメーションがR状態にあるか、T状態にあるかによって決まる酸素化状態）および3) チオールがNO⁺の転移を促進するに足る濃度で存在するかどうか。

第1の要因の重要性は図4Aに示されている。Hb (FeII) O₂とSNO-Hb [FeII] O₂は血管収縮因子として作用するが、SNO-Hb [FeIII] (FeIIがFeIIIに酸化されたメト型) は血管拡張因子として作用する。図4Aは、ヘムに結合した酸素を持ちSNO/Hb比が2であるSNO-Hb [FeII] O₂が強力な血管収縮因子として作用することを示している。

SNO-Hb (FeII) も血管拡張因子である。図2Bは、第2の要因を説明するものであり、RSNOの分解および転移速度が、オキシ状態にあるSNO-Hbよりもデオキシ状態にあるSNO-Hbの方がはるかに速いことを示している。

SNO-HbのNO⁺供与特性が酸素濃度にどのように依存するかがわかる。SNO-Hbは酸素濃度の低い部位または酸化条件下にある部位で酸素を放出する。SNO-HbはそのNO基を放出して、1) ヘムFeのFeIIIへの酸化または2) 脱酸素化によるヘムからのO₂の喪失のいずれかによる血管拡張を引き起こす。図2Bには、NOがデオキシ状態でもっともよくSNO-Hbから転移除去されることが示されている。虚血では、SNO-Hbが脱酸素化し、その後速やかにNOの喪失が起こる。このデータから、1SNO/SNO-メトHbの比を持つSNO-メトHbは、2SNO/SNO-オキシHbの比を持つSNO-オキシHbより強力な血管拡張因子であることがわかる。HbのS-ニトロシル化がR状態(オキシコンフォーメーション)を誘導することに注目すべきである。したがって、1SNO/SNO-オキシHbの比を持つ1つのSNO-オキシHb分子は、0.1SNO/SNO-オキシHbの比を持つ10分子のSNO-オキシHbより効力が弱いことになる。

第3の要因は図4Bに示す結果によって例証される。これらの結果は、SNO-Hb (FeII) O₂とSNO-Hb (FeIII) の血管拡張因子効果のチオールによる増強を証明して

いる。SNO-Hbから低分子量ニトロソチオール類へのNO⁺の転移は、Hbがオキシ状態にあるときと比べてデオキシ状態にあるときの方が効率がよく(図2B)、また、オキシ状態にあるときと比べてメト状態にあるときの方が効率がよい(図4C)。

NO⁺は、SNO-HbからNO⁺(ニトロシルカチオン)として放出または転移される。SNO-HbのSNO基はNO⁺特性を持つ。SNO-HbからのNO⁺の転移は、グルタチオンなど

の小さなチオール類に対して最も効率よく起こり、ヘムが酸化されている場合（SNO-メトHb）または該SNO-Hbがデオキシ状態にある場合に最も効率がよい。

これらの発見がもたらす本発明の一態様は、小分子量チオール類がある形態のSNO-Hbと共に、NOの生理作用を必要とする哺乳動物に同時投与することにより、SNO-Hbから小さなチオール種へのNO⁺の転移を増大させ、それによって組織にNO生理活性を送達する治療法である。NO放出の効果をさらに増大させるためには、メトHbまたはデオキシHb（または等価なコンフォメーションまたは спин状態）のSNO-型をチオールと共に投与することが好ましい（例えば図2Bを参照のこと）。SNO-メトHbとSNO-オキシHbの混合物、およびさらにチオールをも含む混合物を使用することもできる。これら成分の組成および比率は、その疾患状態に依存する。例えば、O₂送達とNO送達の両方を増大させるには、SNO-オキシHbを使用することができる。例えば急性呼吸障害症候群のように、O₂のさらなる送達が望ましくない場合は、メトHbおよびデオキシHbのSNO-型が特に好ましい。別法として、SNO/Hbの比率を調節することによって、O₂放出を調節することもできる。

図4Aの血管環バイオアッセイのデータは、図5のイン・ビボのデータとよく一致している。実施例5に記載の実験の結果から、Hb (FeII) O₂ (オキシHb) がイン・ビトロと同様にイン・ビボでも血圧の上昇を引き起こすことが確認される。SNO-Hb (FeIII) (SNO-メトHb) は、イン・ビトロおよびイン・ビボで血圧の低下を引き起こす。SNO-Hb (FeII) O₂ (SNO-オキシHb) は、対応する血管環バイオアッセイで認められた張力の増大とは対照的に、イン・ビボでは血圧に対して無視

しうる程度の効果しか持たない。SNO-オキシHbの場合、そのイン・ビボの効果は中性である。これは、ヘムに結合されることになるNOが引き起こす収縮効果が、脱酸素化時のNOの放出によって相殺されるということによって説明できる。したがって、SNO-オキシHbは血圧に最小限の効果しか与えずにO₂を送達することができる。

本明細書に記載の結果を知れば、血管に対して収縮効果または拡張効果を持つ、あるいは血管に対して何の効果も持たない、予測されたNO放出特性を持つHbタ

ンパク質を合成することができる。もう1つの選択は、酸素化型を作製して、それをO₂送達が望ましい医学的状態に投与するか、脱酸素化型を作製して、それをO₂送達が望ましくない医学的状態に投与するかの選択である。

特定の望ましいO₂およびNO送達特性を持つ様々な修飾Hbを生産することができる。例えば、R状態にあるHbまたはR構造（オキシHb）は、いくつかの既知の方法により、T状態またはT構造（デオキシHb）に変換することができる。これは、例えばイノシトール六リン酸とHbとの反応によって行なうことができる。また当業者には、例えばカルボキシペプチダーゼでHbを処理することなどにより、R状態にあるHbを製造できることも知られている。同様に、フェリシアン化物や亜硝酸塩を使用してメトHbを合成できることも知られている。

T状態に固定されたHb分子の製造は、NOの運搬体よりはむしろNOの生理活性供与体の形態で存続するRSNO-Hbの合成を可能にする。R状態に固定されたHbは、1分子あたりに最大量のNOを保持するRSNO-Hbを合成するための基質として使用できる。

本発明のもう1つの態様は、O₂放出とNO放出を制御するために、Hbの1以上のチオール基が、ある程度に、特異的にS-ニトロシル化されている1以上の形態のHbからなる代用血液である。処置されるべき状態には、NOもしくはO₂送達が望まれる状態、NOもしくはO₂利用が望まれる状態、またはNOもしくはO₂が過剰な状態がある。例えば、過剰な酸素フリーラジカルと過剰なNO[·]の存在を特徴とする

医学的状態では、SNO-HbのヘムとSNO-Hbによって放出されるNOの両方が、酸素フリーラジカルを捕捉するのに役立つ。ヘムFeは酸素フリーラジカルとNO[·]を捕捉する過程で酸化され、NOはチオールへの供与によって酸化型Hbからの非毒性RSNO[·]の形で放出される。例えば炎症と再灌流損傷は、過剰なNO生産と過剰な酸素フリーラジカルを特徴とする。種々の形態のHbは酸素ラジカルと遊離NOを捕捉し、NOを毒性でない形態に変換する。

本発明のさらなる態様は、ニトロソ化Hb型からなる代用血液の投与に基づく、生理活性型のNOもしくはO₂の送達またはその両方が有益な状態の治療法である。例えば、SNO-Hbは心筋梗塞の処置に有用である。SNO-HbはNOを供与し、血管を広

げておく効果を有する。SNO-Hbは低酸素圧で脱酸素化して、酸素を送達すると共に同じ部位でNOを放出し、それによって血管拡張を引き起こす（例えば実施例7および図6A～6Fを参照のこと）。SNO-Hbの投与と同時に、またはその前後に、チオールを投与することによっても、これらの効果を増大させることができる。例えば、心筋梗塞を処置する目的には、低いSNO/SNO-Hb比を持つ高濃度または高投与量のSNO-Hbがふさわしい。別法として、SNO-メトHbをこの目的に使用することもできる。

もう1つの側面として、本発明は、SNO-Hbまたは他の型のニトロソ化Hbを、そうしなければS-ニトロシル化されていないHbにおけるオキシHbからメトHbへの変換によって消費されるであろうニトロソ血管拡張薬（例えばニトログリセリン）と同時投与することにより、NO供与療法を強化する方法でもある。

血小板活性化は、多数の事象および血小板の内皮下層などの非血小板表面への粘着に応答して起きる反応によって明らかにされる。膜リン脂質を加水分解する一連の事象の進行におけるトロンビン、エピネフリンまたはコラーゲンのセットなどのアゴニストの結合は、アデニル酸シクラーゼを阻害し、細胞内カルシウムに移動性を持たせ、非常に不可欠な細胞内蛋白質をリン酸化する。活性化に続いて、血小板は、その顆粒含有物を血漿に分泌し、次に近接した血小板の止血栓への

結合を許容させる (Harrison's Principles of Internal Medicine, 第12版、J. D. ウィルソン, (J. D. Wilsson,) ら編、マクグローハル社(McGraw-Hill, Inc.), ニューヨーク、1991参考)。

血栓は、血管または心臓中に形成された血の病理学的な凝固である。それは、その最初の位置に付着したままでもよいし、または今まであった位置から移動し、循環系内の新規な部位に移動してもよい。血栓塞栓症は、今まであった位置から移動した血栓または血栓の一部が部分的にまたは完全に血管を閉塞し、影響が及ぼされた組織への酸素輸送を妨げる時に起こり、ついには組織壊死を生じる。

傷害が血管の表面に起こっている部位は、特に血栓の形成を受けやすい。これらの部位としては、内皮への傷害、血管の狭くなったところもしくは血管の狭窄、またはアテローム性動脈硬化症プラーク蓄積が起きている血管の内部表面にあ

る部位があげられる。

NOは、血栓形成の初期段階を調節する生理学的物質として定義されるいくつかの内皮由来血栓制御因子の1つである。特に、NOは、考えられるに、血小板グアニル酸シクラーゼを活性化することにより、内皮細胞表面における血小板粘着、活性化および補充を減少させ、これを達成し、それによって、血小板細胞内cGMPを増加させ（スタンラー、J. S. (Stamler, J. S.)ら、*Circ. Res.* 65:789-795(1989)）、Ca²⁺レベルを減少させる。NOおよびプロスタサイクリン(prostacyclin)プロstagランジン（PG）I₂は、共同的に作用して、内皮下層マトリックスのコラーゲン纖維からの血小板解離を阻害および積極的に媒介する。また、プロスタサイクリンと違い、NOは、血小板粘着を阻害する。さらに、血小板はNOを合成し、L-アルギニン-NO経路は、内在性の負のフィードバック機構として作用して、血小板反応性を制御する。NOは、白血球と血管壁との相互作用に伴われ、好中球凝集を阻害し得る（review article、デービス、M. G. (Davies, M. G.) ら、*British Journal of Surgery* 82:1598-1610(1995)参照）。

NOは、多数の方法において抗アテローム形成である（例えば、キャンディパン、R. C. (Candipan, R. C.) ら、*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16:44-50, 1996.）。NOは、平滑筋増殖を阻害し、LDL（低密度リポ蛋白質）酸化および他のオキシダント関連過程を弱める。

ヘモグロビンは、そのNO捕捉特性の結果としてアテローム性動脈硬化症ならびに血栓症を促進する。このヘモグロビンの限界は、一酸化窒素に対する高い親和性から得られる。In vitroでは、NOは、血小板凝集ならびにコラーゲン纖維、内皮細胞マトリックスおよび单分子層への粘着の有力な阻害剤である（ラドムスキー、M. W. (Radomski, M. W.) ら、*Br. J. Pharmacol.* 92:181-187 (1987)；ラドムスキー、M. W. (Radomski, M. W.) ら、*Lancet* 2:1057-1058(1987)；ラドムスキー、M. W. (Radomski, M. W.) ら、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148:1482-1489 (1987)）。NOは、血小板におけるcGMPレベルを上昇させ、それによって、血小板結合フィブリノーゲン分子を減少させ、細

胞内Ca⁺⁺流動および血小板分泌を阻害する（メリオン, B. T. (Mellion, B. T.) ら、Blood 57:946-955(1981)；メンデルソン, M. E. (Mendelson, M. E.) ら、J. Biol. Chem. 165:19028-19034 (1990)；リーベルマン, E. (Lieberman, E.) ら、Circ. Res. 68:1722-1728(1991)）。Hbによる一酸化窒素の捕捉は、その分子が血小板を阻害するのを妨げる。この説明は、in vivo研究により支持されている（クレジシー, K. (Krejcy, K.) ら、Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 15:2063-2067 (1995)）。

図7A～7Cに示された結果（実施例9参照）は、SNO-Hbなどのニトロソ化ヘモグロビンを、増加した血小板析出、活性化ならびに血栓形成または血小板および凝固蛋白質の消耗の結果として起きる急性の血液凝固事象の治療に用い得ることを示している。かかる合併症は、当業者に公知であり、例えば、心筋梗塞、肺血栓塞栓症、大脳血栓塞栓症、血栓静脈炎および不安定アンギナ、ならび

に前述の障害の結果として直接的または間接的いずれかで起きるいかなる追加の合併症があげられるが、これらに限定されるものではない。

また、SNO-Hbおよび他のニトロソ化ヘモグロビンを予防的に用いて、例えば、血栓症の個人歴もしくは家系図を有する患者、アテローム性動脈硬化性血管症を有する患者、慢性うつ血性心不全を有する患者、悪性疾患有する患者、または妊娠した患者もしくは手術後の固定された患者などの再発の血栓症の危険のある患者における血栓の発生を妨げることができる。

NOは、cGMPを生成する可溶性のグアニル酸シクラーゼを活性することが知られている。cGMPは、血小板凝集の阻害を媒介する。実施例10の結果は、この血小板凝集の阻害がcGMP単独ではなく、さらにいくつかの他の機構によって媒介されているかもしれないことを立証している。

特定の化合物または条件は、四量体の2つの可変的な四次構造、T構造またはR構造のいずれかに対するHbのアロステリック平衡遷移におけるシフトを起こすことが知られている（例えば、ペルツ, M (Perutz, M.)、Mechanisms of Cooperativity and Allosteric Regulation in Proteins, Cambridge University Press、ケンブリッジ大学、イギリス、1990の7～28頁参照）。これらは、

例えば、異型のリガンド H^+ 、 CO_2 、 2, 3-ジホスホグリセリン酸（2, 3-DPG）およびC1-であり、その濃度は酸素親和性を調節する。異型のリガンドは、T構造を特異的に安定化し、強いる追加の水素結合を形成することによって酸素親和性を低くする。アロステリック平衡に影響する他の化合物としては、イノシトールヘキサホスフェート（IHP）およびベザフィブレート（bezafibrate）およびクロフィブレートなどのフィブリン酸誘導体などがあげられる。フィブリン酸誘導体、抗脂血症剤は、デオキシヘモグロビンと結合するが、オキシヘモグロビンとは結合しないことがわかっている。それらは、DPG結合部位とは異なる中央の腔にある部位と結合することによってT構造を安定化させる。ベザフィブリン酸塩に関連する他のアロステリック因子は、合成されている。R構

造を特異的に安定化するリガンドは、酸素親和性を増加させ、T構造を安定化するリガンドは、逆である。他のリガンドは、ヘムのスピニ状態に影響するかもしれない。例えば、デオキシヘモグロビンおよびメトヘモグロビンにおいて、鉄は高スピニ鉄 ($S = 2$) で、5つ配位結合する；オキシヘモグロビンおよびシアンーメトHbにおいて、鉄は低スピニ鉄 ($S = 0$) で、6つ配位結合する； H_2O が6番目のリガンドであるとき、メトヘモグロビンも高スピニである。図7Cにみられる血小板凝集のS-ニトロソーメトヘモグロビンによる阻害は、高スピニコンホメーションにおける促進された能力と一致する。ヘモグロビンのアロステリック平衡状態またはスピニ状態をコントロールするかかる物質は、ヒトまたは動物に投与して、特定のアロステリック構造および／またはスピニ状態の形成を促進してもよいし、特定のアロステリック構造および／またはスピニ状態を安定化してもよい。

血小板阻害の目的で、NOを送達するために必要とされるHbの投与量を滴定して、血圧の劇的な変化を生じさせない効果的な量のNOが提供される。治療の目的が酸素を送達することであるならば、Hbは、血圧の低下を回避するために血液単位で投与してもよい。治療の目的が発作を緩和することであるならば、心筋梗塞に与えられる量と比較して、ごくわずかのHbしか投与され得ない。心筋梗塞に与えられる量と比較して、Hbは非常にわずかしか投与されない。発作に対

しては、より重要な目標は、酸素を送達することよりもむしろNOを送達することである。好ましくは、連続的注入または1日あたり数回の注入を用いてもよい。実施例12（図10参照）は、ラット脳における血液流でのSNO-Hb（Fe II）O₂の効果が20分間にわたって持続することを示す；他の実験においては、効果は1時間までの間みられた。血圧効果および血小板阻害効果の間に相関があるが、血小板阻害は、血圧効果を生じるために必要とされるよりも低いNO濃度で起き、一般的により長く続く。

実施例11は、S-ニトロソチオールを用いて、NO基をヘモグロビンのシス

テイン残基のチオール基だけでなく、ヘモグロビン分子の他の反応部位にも付加することができることを示す。実施例11のニトロソ化反応の生成物は、Hb四量体あたり2個以上のNO基を有するヘモグロビン分子であった。NOの付加の正確な部位は、確かめられていないが、NO付加が金属などのHb内のチオール基および様々な他の求核性部位で起きることが期待される。チオール基に関して、反応部位は、チオシン残基およびアミン、ならびに他の求核性中心である。

他の蛋白質におけるニトロソ化反応は、以前に研究されている（Simon, D. I. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:4736-4741(1996)）。蛋白質を修飾してニトロソ蛋白質を製造する方法は、当該分野において公知であり、例えば、37℃で15分間0.5M HCl（酸性化されたNO₂⁻）中でNaNO₂に蛋白質を曝露する方法などがあげられる。他の方法としては、100mMリン酸ナトリウム、pH 7.4中の蛋白質のヘリウム脱酸素化溶液を透析チューブ内に入れ、15分間透析物中にバブリングしたNOガスに蛋白質を曝露することである（Stamler, J. S. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:444-448(1992)；また、ニトロソ化のさらなる方法を提供するWilliams, D. L. H. Nitrosation, Cambridge University Press, New York (1988) 参照）。

これらの方法により、複数のNO関連修飾（ニトロソ化、ニトロシル化またはニトロ化から得られた「NO基」または「NO生物学的等価物」）は、Hbにおいて求核性部位で行なわれ、求核性部位としては、チオール、アルコールにおいてみられるような求核性酸素原子、アミンにおいてみられるような求核性窒素原

子、またはヘム鉄などがあげられてもよい。Hbのニトロソ化、ニトロシル化またはニトロ化を促進する作用剤は、「NOまたはNO⁺供与剤」として考へることができる。かかる修飾の生成物は、例えば、-SNO、-SNO₂、-ONO、ONO₂、-CNO、-CNO₂、-NNO、-NNO₂、-FeNO、-CuNO、-SCuNO、SF₆NOなどの基ならびにそれらの異なるイオン化型および酸化派生型などの基を有していてもよい（ヘモグロビンのCu⁺⁺による酸化について、Winterbourne, C., Biochemistry J. 165: 141-148(1977)）。蛋白質におけるNO基のスルフィドリル残基への共有結合は、S-ニトロシル化として定義される；NO基のFeなどの金属への共有結合は、ニトロシル化と呼ばれる。通常の求核中心へのNOの結合は、ニトロソ化と呼ばれる。このように、ニトロソ化ヘモグロビンという用語は、SNO-HbおよびHb (Fe II) NO、ならびにチオールおよび金属に加えて他の部位でニトロソ化された他の型のヘモグロビンを含む。さらに、Hbは、ニトロ化されてもよい。複数の異なるタイプの求核部位でニトロソ化および／またはニトロ化されているHb（それぞれ、ポリニトロソ化、つまりチオールおよび他の求核部位に付加されたNO等価物を有する；またはポリニトロ化と呼ぶ）は、ニトロソ基転移反応ならびに循環系における異なる速度および発生する異なる能力でのNOおよびその生物学的等価物放出を可能にする。

これらならびに他のニトロソ化反応およびニトロ化反応は、ある範囲までのヘムFeの酸化を起こすことができる。しかしながら、ある程度の少ない酸化は、許容可能である。少ない程度までの酸化であれば、ニトロソ化Hbは、いまなお治療剤として有用である。ニトロソ化HbのO₂送達機能よりもむしろNO送達機能がより望ましい適用に対しては、ヘム鉄の広範囲の酸化が許容可能である。

ヘム鉄の酸化を回避することが望ましいならば、ヘムを除去し、蛋白質に対して必要な化学的反応を行って望ましい範囲までニトロソ化し、ヘムを修飾されたヘモグロビン産物中に再配置することが可能である（ヘムの除去および再配置について、Antonini, E. および Brunori, M., Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands, Elsevier, New York, 1971を参照）。

実施例1および2に示したように、低分子量RNSO種への短時間の曝露など

のヘムを酸化しない条件下でのニトロソ化に加え、他の方法を用いて、ヘムFeが酸化されないニトロソ化ヘモグロビンを生成することができる。例えば、組み換え法によって α グロビン鎖および β グロビン鎖を生成し、それらを所望の程度

までニトロソ化し、次に該鎖をヘムと会合させて機能的ニトロソ化四量体を形成する（例えば、1990年5月10日に出願され、1996年3月13日に公表された欧州特許出願EPO第700997号、「ヘモグロビンおよびそのアナログの細菌および酵母における製造」）。

最終産物としてメトHb型を製造することなく、 α グロビン鎖および β グロビン鎖をニトロソ化する他の方法は、無傷のHbの分子を所望の程度までニトロソ化し、それによってヘムFeを酸化させ、次にメトヘモグロビンリダクターゼまたはナトリウムシアノボロヒドリド(cyanoborohydride)などのシアノボロヒドリドのいずれかでニトロソ化Hbを処理することによってヘムFeを還元する方法である。

本明細書で使用するヘモグロビンまたはHbという用語には、突然変異型、化学修飾型、融合タンパク質のような遺伝子改変型、あるいは欠失型などといった変種型が含まれる。また、あらゆる動物種のHbおよびそれらの変種型も含まれる。これらの変種Hbの生物学的特性および/または化学的特性は、動物中に天然に認められるヘモグロビンの特性とは異なってもよい。

NOが生物学的系中で一酸化窒素ガスとしてだけではなく、種々の酸化還元型でも存在し、またS-ニトロソタンパク質、S-ニトロソアミノ酸その他のS-ニトロソチオール種を含みうるS-ニトロソチオール類のような、一酸化窒素の生理活性付加物としても存在することは理解されるだろう(Stamler, J.S., Cell, 78:931-936(1994))。

代用血液は、酸素の運搬および/または送達、NOの運搬および/または送達、フリーラジカルの捕捉などといった、哺乳動物に認められる天然血液の1以上の機能を果たす生物適合性の液体でありうる。代用血液は、哺乳動物中に注入された時に天然の血液の1以上の機能を果たすような液体の1以上の成分からなってよい。代用血液の例には、種々の形態のヘモグロビン製剤がある。かかる製剤は

、ニトロソ基転移を行う、低分子量のチオール、ニトロソチオールまたはNO

供与剤などの他の生理活性成分をも含んでいてもよい。

医学的処置に使用される本発明の化合物と治療用製剤は、当業者が決定できる適當な組成物中で、治療上の有効量で使用されるものとする。その医学的障害に冒された部位または系に最も適した投与法は、当該技術分野で知られている。好適な化合物は、生理活性成分と共に、当業者に公知の担体、安定化剤または不活性成分を含んでいてもよい。

本発明の目的の「治療上の有効量」という用語は、その意図する目的を達するのに効果的なニトロソ化Hbおよび／またはニトロソ化作用剤の量をいう。個体によって変化を必要とするが、投与する各化合物の効果的な量の最適範囲の決定は、当業者の技術の範囲内である。イヌ、ヒヒまたはラットなどの実験動物を用いて、投与量を決定できる。通常、有効量の組成物または調製物を提供するために必要な投与量は、当業者によって調整され、レシピエントの年齢、健康、肉体状態、性、体重、症状の程度、処置の頻度ならびに所望の効果の性質および範囲に依存して変化する。当業者は、従来の考察を用いることにより（例えば、適當な従来の薬理学的プロトコルを利用することにより）、特定の患者に対する投与量を決定することができる。必要ならば、好適な医薬担体を、治療用組成物に使用する作用成分と混合してもよい。

本発明を以下の実施例でさらにより詳しく説明する。

実施例

実施例1：NOおよびRSNOのHbとの相互作用

NOやRSNOなどの天然に存在するN-オキシド (Gaston, B.ら, (1993); Scharfstein, J.S. ら, J. Clin. Invest., 94:1432-1439 (1994) ; Clancy, R.M. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:3680-3684 (1994)) は、Hbとの反応に関して、著しく異なることが観察された。NOは、極めて迅速にデオキシHb (Hb [FeII])

に結合して比較的安定なHb [FeII] NO錯体を形成し（図1A）、オキシHb (Hb [FeII] O₂) をメトヘモグロビン (Hb [FeIII]) と硝酸塩に変換し（図1B）、過去

の報告 (Olson, (1981) ; Toothill, C., Brit. J. Anaesthy., 39:405-412 (1967)) を追認している。これに対し、RSNO種は、Hbのスルフヒドリル基とのニトロソ基転移反応に参加してS-ニトロソヘモグロビン (SNO-Hb) を生成することがわかり、デオキシHbまたはHb (FeII) O₂いずれかのヘム中心とは反応しなかつた (図1Cおよび1D)。

A. N0のデオキシHbとの相互作用

一酸化窒素の濃度を増大させると、Hb (FeII) のインキュベーションにおいて、デオキシHb (Hb [FeII]) のHb (FeII) N0への変換が観察される。a. デオキシHb。b. c. d. それぞれ比率が1:1、2:1 および10:1のN0とHb (FeII) の反応混合物。反応生成物Hb (FeII) N0は、実質上、N0の添加の瞬間に（すなわち、装置の不感時間以内に）生成した。

B. N0のオキシHbとの相互作用

N0の濃度を増大させると、オキシHbのインキュベーションにおいて、オキシHb (Hb [Fe [II] O₂]) のメトHb (HbFe [III]) への変換が観察される。a. オキシHb。b. c. d. それぞれ比率が1:1、2:1および10:1のN0とオキシHbを含有する反応混合物。メトヘモグロビンの生成は、N0の添加の瞬間に（すなわち、装置の不感時間以内に）起こった。

C. S-ニトロソチオール類のデオキシHbとの反応

GSNO (表示) またはS-ニトロソシステイン (CYSNO) のデオキシHbとのインキュベーションにおいて、Hb (FeII) のSNO-Hb (FeII) への変換が観察される。RSNOのHbのヘム官能基との相互作用は（あったとしても）ほとんどない。a. デ

オキシHb。b. c. d. それぞれ比率が1:1、2:1 および10:1のGSNOとHb (FeII) の反応混合物。スペクトルは、bとcでは60分間のインキュベーションの後、dでは15分後に記録した。反応生成物をさらに分析したところ、いずれの場合にも、ほどほどの量のSNO-Hbの生成が認められた。60分の時点でのb. c およびdにおけるSNO-Hb (S-N0/Hb) の収率は、それぞれ2.5%、5%および18.5%であった（図1Dおよび図2Aを参照）。

D. S-ニトロソチオール類のオキシHbとの相互作用

GSNO（表示）またはCYSNOのオキシHbとのインキュベーションにおいて、Hb (FeII) O₂のSNO-Hb (FeII) O₂への変換が観察される。Hb (FeII) O₂のヘム中心におけるGSNO（またはCYSNO）の反応は（あったとしても）ほとんどない。すなわち、ヘムに対するO₂結合能は、RSNO種によって影響されない。a. オキシHb。b. c. d. それぞれ比率が1:1、2:1 および10:1のGSNOとオキシHbの反応混合物。スペクトルは、分光光度計中で60分間のインキュベーション後に記録した。反応生成物をさらに分析したところ、いずれの場合にも、SNO-Hbの生成が認められた。スペクトルb、c およびdにおけるSNO-Hbの収率は、それぞれ5%、10%および50% (S-N0/Hb) であった。他の5回の測定では、S-N0/Hb の収率は、GSNO (pH7.4、Hbに対して10倍過剰) を用いた場合で0.37±0.06、CYSNO を用いた場合で約2SNO／四量体 (1.97±0.06) であった（下記参照）。最後に記したこれらのデータは、ヒトHbA が滴定可能なSH基を2つ含有するという報告と合致している。

方法

ヒトHbA₀は、既に記述されているようにして赤血球から精製した(Kilbourn, R.G.ら, Biochem. Biophys. Res. Comm., 199:155-162(1994))。一酸化窒素溶液は厳密に脱気し、一般的な手法 (Beckman, J.S. ら, Methods in Nitric Oxide Research, FeelischおよびStamler 編, Wiley Chichester, 英国 (1996)) に従って精製し、飽和溶液を気密シリングに移した。Hbの脱酸素化は、過剰の亜ジチオン酸塩の添加 (NO研究)、もしくはツンベルグ管での脱気によるHb (FeII) O₂の還元 (RSNO研究; RSNO種は亜ジチオン酸塩と反応するため) によって行なった。RSNO種は既に記述されているように合成した(Gaston, B.ら, (1993); Arnelle およびStamler, (1995))。HbA₀とのインキュベーションは、リン酸緩衝液pH7.4、0.5mM EDTA中で行なった。SNO-Hbの定量は、セファデックスG-25カラムでタンパク質を精製した後、Saville の方法 (Gaston, B.ら, (1993); Stamler, J.S. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:444-448 (1992)) に従って行なった。溶液中の遊離NO_xを分析するSaville 法には、スルファニルアミドとのジアゾ化反応と、それに続く発色团N- (ナフチル) エチレンジアミンとのカップリングが必

要である。低分子量S-NO複合体はいずれもこの精製過程には耐えず、すべての活性は沈殿可能な蛋白質であった。反応とスペクトルは、Perkin Elmer UV/Vis Spectrometer, Lambda 2Sを用いて行なった。

実施例2：Hb-S-ニトロシル化の調節に関するO₂のアロステリック機能

Hbの酸素化は、アルキル化試薬に対するcys β 93の反応性を増大させるコンフォメーション変化を伴う (Garel, C. ら, J. Biochem., 123:513-519 (1982) ; Jocelyn, P.C., Biochemistry of the SH Group, Academic Press, ロンドン, 243 頁 (1972) ; Craescu, C.T. ら, J. Biol. Chem., 261:14710-14716(1986))

。この効果の生理学的意義は決して確立されていなかった。HbのS-ニトロシル化速度がコンフォメーション状態に著しく依存することが観察された。オキシコンフォメーション (R状態) では、S-ニトロシル化がデオキシコンフォメーション (T状態) よりも速かった (図2A)。S-ニトロシル化の速度は、どちらのコンフォメーションでも、アルカリ条件 (これは、アルカリ条件下でなければC末端のヒスチジン146 β によって反応から遮蔽されているcys β 93を露出させる

傾向がある) によって加速された (すなわちpH9.2での速度>pH7.4での速度) 。このヒスチジン残基を拘束している塩橋 (asp β 94---his β 146) は高pHで緩やかになる。これらのデータは、R状態に伴うチオール反応性の増大が、少なくとも部分的には、コンフォメーションが誘導するpKの変化よりはむしろ、NOの接触が改善されることに由来することを示唆している。

A. 酸素化はHbのS-ニトロシル化を加速する

S-ニトロソシステイン (CYSNO) によるHb-S-ニトロシル化の速度は、デオキシ状態 (Hb [FeII]) よりもオキシコンフォメーション (Hb [FeII] O₂) にある場合の方が速い。

方法

インキュベーションは、タンパク質 (50 μ M) に対して10倍過剰のCYSNO を用いて、曝気した2%ホウ酸塩、0.5mM EDTA中 (オキシHb) 、もしくは迅速なO₂排気後のトノメーター中 (デオキシHb) で行なった。表記の時間に、試料をG-25カラム (リン酸緩衝食塩水、0.5mM EDTA、pH7.4で予め平衡化) に通して迅速に脱塩

してCYSNOを除去し、Savilleの方法 (Stamler, J.S. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:444-448 (1992)) によってSNO-Hbを分析した。

B. 脱酸素化はHbの脱ニトロシル化を加速する

RSNO分解（および転移）の速度は、オキシ状態 [SNO-Hb (FeII) O₂] よりもデオキシコンフォメーション [SNO-Hb (FeII)] にある場合の方がはるかに速い。SNO-Hb (FeII) の分解は、過剰のグルタチオンの存在によってさらに加速される。我々の測定の不感時間（約15秒）以内に、SNO-Hb (FeII) の大部分がGSNOに変換された。

方法

PBS (0.5mM EDTA, pH7.4) 中のHbを、空気下（オキシ）または予めO₂を排気したトノメーター中（デオキシ）でインキュベートした。SNO-Hb (FeII) O₂分解は Savilleの方法 (Saville, B., Analyst, 83:670-672 (1958)) によって測定した。SNO-Hb (FeII) の自発的分解を、Hb (FeII) NOの生成により、分光測光法で追跡した。グルタチオンとのニトロソ基転移反応は、タンパク質 (50 μM) に対して100倍過剰のグルタチオンを添加することによって行ない、その反応混合物を嫌気条件下に直ちに処理し、迅速なTCA沈殿を行い、上清中のRSNOを分析した。NO基転移の速度は速すぎて、この研究で使用した標準的方法では正確には測定できなかった。

実施例3：生理学的系におけるHbのシステイン残基とのNO関連相互作用

Hbは、主として赤血球に含まれることから、細胞内タンパク質のS-ニトロシル化を起こす可能性のある機構を探査した。酸素化したラット赤血球のS-ニトロソシステインとのインキュベーションにより、極めて迅速な細胞内SNO-Hb (Fe II) O₂の生成が起こった（図3A）。Hbの迅速な酸化は、これらの条件下で観察されなかった。また、赤血球内SNO-Hbは、赤血球をS-ニトロソホモシステインまたはS-ニトロソシステイニルグリシンで処理した場合にも生成したが、S-ニトロソグルタチオン (GSNO) で処理した場合には生成しなかった。したがって、RSNOの赤血球接触は、チオール基特異的である。酸素化した赤血球をNOにさらすと、主としてメトHb生成が起こった。

内皮由来弛緩因子 (EDRF) とヘモグロビン

内皮依存性弛緩のHb媒介的阻害は、一般にNO応答のマーカーとして使用されている。Hbの金属中心またはチオール中心との反応は、NO/EDRF（内皮由来弛緩因子）応答の減衰をもたらすはずであるから、本発明者らは、阻害の分子的根拠を

解明しようとした。β93チオール基がN-エチルマレイミド (NEM) で遮断されているHb調製品、またはヘムガシアンメト (FeIIICN) 誘導体化によって遮断されているHb調製品を大動脈環バイオアッセイで調べ、それらの活性を天然Hbの活性と比較した。シアンメト-Hb とNEM-Hbは共に、血管緊張の増大を引き起こし、アセチルコリン (EDRF) が媒介する弛緩を減衰させた (図3B)。しかし、天然Hbは、修飾されたHb調製品のいずれよりも有意に有効であった (図3B)。総合すると、これらの研究は、Hbのチオール基と金属基が共にそのNO関連活性に寄与することを示唆している。HbにおけるS-ニトロソチオールの生成を立証するために、胸部大動脈の2cm 切片をタイゴン管に挿入し、そのタイゴン管を通して、Hb (4 μM) およびACh (2 μM) を含む3cc のクレブス溶液をローラーポンプで循環 (1.5cc/分 × 5分) させるバイオアッセイを用いた。流出液を分析 (Gaston, B.ら, (1993)) したところ、5実験中5実験でSNO-Hb (20±4nM) の生成が認められた。

A. 赤血球内HbのS-ニトロシリ化

ラット赤血球をS-ニトロソシステイン (ヘム (5mM) に対して等モル；リン酸緩衝液pH7.4, 25°C) と共にインキュベートすると、細胞内SNO-Hb (FeII) O₂ が迅速に生成する。メトHbは迅速には生成しない。G-25カラムを通して細胞内RS NO種を分離すると、ほとんどの時点で、低分子量S-ニトロソチオール (例えばGSNO) として存在するのはわずかな割合にすぎないことがわかる。60分までに、Hbの4つの利用可能なSH基のうち3つがS-ニトロシリ化される (ラットHbは4つの反応性SH基を含有することに注意)。挿入図は、ラット赤血球から単離したSNO-Hbのスペクトルおよびそれに関連する分析を示す。スペクトルAは、G-25クロマトグラフィー後に赤血球から単離したSNO-Hbのスペクトルである。Aを亜ジチオン酸塩で処理するとS-NO部分の還元が起こって遊離のNOが放出され、それが

デオキシHbによって自己捕捉されてHb (FeII) NOが生成する（亜ジチオン酸塩が

同時にHbを脱酸素化することに注意）（スペクトルC）。このスペクトル（C）は、四量体あたり約3個のS-NOの化学量論を示している。比較のために、四量体あたり4個のNOを含有するHb (FeII) NOのスペクトルを示す（挿入図、スペクトルB）。

方法

表記の間隔で、赤血球を遠心分離によって迅速にペレット化し、3回洗浄し、4℃の脱イオン水中で溶解し、その細胞質画分をG-25カラムに通して迅速に脱塩した。細胞内SNO-Hbを、Saville の方法 (Gaston, B. ら, (1992); Stamler, J.S. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:444-448 (1992)) で測定し、前記のように分光法（挿入図）で確認した。

B. EDRF/Hb 相互作用の分子的根拠

EDRF応答に対する天然Hbの効果を、チオールまたはヘム中心がそれぞれアルキル化もしくはシアノメト誘導体化によって遮断されているHb調製品と比較した。いずれのHb調製品も収縮を引き起こしたが、天然Hb (SH中心と金属中心が共に自由に相互作用できる) による収縮が最も著しかった。同様に、アセチルコリン (ACh) が媒介する弛緩も、天然Hbによって最も効率よく阻害された。シアノメトHb (CN-Hb) (ヘムが反応から遮断されている) とNEM-Hb (チオール基がN-エチルマレイミドによってアルキル化されている) では、弛緩が阻害される程度が低かった。これらのデータは、Hbのヘムと β 93SH基の両方が、EDRF応答の反転に寄与することを例証している。同様の条件下でEDRFから生成するSNO-Hbの直接測定は、本文 (the text) に記述されている。

方法

ウサギの胸部大動脈を3mm の環に切断し、等尺性緊張の測定用の力変換器（モルFT03、Grass Instruments、マサチューセッツ州クインシー）に取り付けたスターラップに装着した。このバイオアッセイ系の詳細は、既に記述されている (Stamler, J.S. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:444-448(1992))。シアン

メトHbは、ヒトHbAから、公表された手法 (Kilbourn, R.G. ら, Biochem. Biophys. Res. Comm., 199:155-162(1994)) に従って調製した。HbA をN-エチルマレイミドでアルキル化した後、G-25セファデックスに通して脱塩して、過剰のNEM を除去した。修飾されていないHbcys β 93の除去は、Hg含有アフィニティカラムを通過することによって達成した。遊離SH基のアルキル化は、5,5'-ジチオ- ピス [2-ニトロ安息香酸] を用いて確認した。

表 1

添加物	緊張の増加% (↓)	ACh弛緩% (↑)
Hb (1 μ M)	40.8 ± 2.8 (n=7)	31.9 ± 6.9 (n=7)
NEM-Hb (1 μ M)	29.4 ± 1.3 ** (n=7)	60.5 ± 3.9 * (n=7)
CN-Hb (1 μ M)	12.9 ± 3.0 ** (n=6)	80.7 ± 1.0 ** † (n=4)
ACh (1 μ M)		98.3 ± 0.6 (n=10)

* , P < 0.01 ; ** , P < 0.001 、 Hb と比較して ;

† , P < 0.001 、 ACh と比較して

実施例 4 : SNO-Hb 血管活性の伝達

動脈赤血球は生理学的に重要な 2 つの形態のヘモグロビン、Hb (FeII) O₂ と Hb (FeIII) を含有する (Antonini ら (1971))。赤血球内 Hb の S - ニトロソチオール含量に関する動脈 - 静脈差は、NO 基が赤血球輸送の間に放出されることを唆している。これらの発見から、おそらくはヘムの酸化還元状態とリガンドによるその占有が、機能的結果に影響を与えるのだろうという可能性が生じる。興味深いことに、血管環バイオアッセイで調べた場合、SNO-Hb (FeII) O₂ は、あまり強くない NO 様活性を持つことがわかった。すなわち、SNO-Hb (FeII) O₂ が引き起こす収縮は、天然 Hb (FeII) O₂ の場合よりも少なく、S - ニトロシル化が Hb の収縮作用を一部反転させることを示した (図4A)。これに対し、SNO-Hb (FeIII) は、血管拡張因子であることがわかった (図4A)。遊離の NO が Hb (FeII) O₂ または

Hb (FeIII) の存在下に弛緩因子活性を全くもたなかつたことは注目に値する (

記載なし)。

赤血球は mM 濃度のグルタチオンを含有する。RSNO種間の平衡は RSNO／チオール交換によって迅速に確立されるので (Arnelle, D. R. および Stamler, J. S., Arch. Biochem. Biophys., 318:279-285(1995))、SNO-Hb の血管活性をグルタチオンの存在下で再評価した。図4Bは、グルタチオンが SNO-Hb (FeII) O₂ と SNO-Hb (FeIII) 両方の血管拡張因子活性を強化したことを見ている。これらの条件における GSNO 生成 (化学的実験とバイオアッセイ試験によって確認した) は、この効果の完全な説明となるようであった。さらに速度論的な分析を行なったところ、グルタチオンが関与するニトロソ基交換は、SNO-Hb (FeII) O₂ よりも SNO-Hb (FeIII) との平衡により強く偏っていることがわかった (図4C)。赤血球における SNO-Hb の定常状態レベルに関する発見 (表2 および 図3A) からすると、これらの結果は、1) 天然に存在する RSNO 種と Hb (cys β 93) の間の平衡が生理学的条件下では SNO-Hb 側にあること、2) SNO-Hb と CSH が関与するニトロソ基転換反応が赤血球内で起こるらしいこと (これらの研究において、SNO-Hb を負荷した赤血球中

に低分子量 RSNO 種がみられた)、および 3) Hb の金属中心の酸化が平衡を GSNO 側に移動させ、それによって生理活性に影響を与える可能性があることを示唆している。

SNO-Hb からの NO 基放出のもう 1 つの機構を探求した。SNO-Hb のレベルに関する動脈 - 静脈差から、S-NO 結合の安定性が脱酸素化に付随する Hb コンフォメーションの変化によって調節されるのかもしれないという可能性が生じた。この可能性を試験するために、SNO-Hb (FeII) O₂ と SNO-Hb (FeIII) からの NO 基放出速度を比較した。脱酸素化は SNO-Hb の分解速度を増大させることができた (図2B)。これらの速度は、GSNO を与える反応ではグルタチオンにより著しく加速された (図2B)。結果は、O₂ - 金属相互作用が S-NO 親和力に影響を与えることを示しており、Hb の新しいアロステリック機能を示唆している。

SNO-Hb が生理学的な意義を持つには、その NO 関連活性が赤血球膜を横切って伝

達されなければならない。SNO-Hbを含有する赤血球を生理学的緩衝液中でインキュベートし、細胞外RSNO種の蓄積を経時的に測定することにより、この可能性を調査した。図4Dは、赤血球が低分子量の（トリクロロ酢酸沈殿可能な）S-ニトロソチオール種をこれらの条件下に輸出することを示している。重要なことに、これらの実験における溶血の程度がわずか(<0.5%)であり、溶解に関する補正是RSNO放出速度に有意な影響を与えたかった。これらの結果により、赤血球内で低分子量RSNO種とタンパク質RSNO種の間に平衡が存在すること、および細胞内に位置することが、血管壁へのNO関連活性の伝達に関して制限的な因子ではないらしいことが確認される。

A. 異なるSNO-Hb調製品の濃度-作用応答

Hb(FeII)O₂(▲)の収縮作用は、S-ニトロシル化によって一部反転されることがわかる(SNO-Hb[FeII]O₂(■); Hb(FeII)O₂に対してANOVAでP=0.02)（図4A参照）。SNO-Hb(SNO-Hb[FeIII])(●)の金属中心の酸化は、この

タンパク質を、他のS-ニトロソタンパク質種(Stamler, J.S.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:444-448 (1992))と同等の効力を持つ血管拡張因子に変換する(SNO-Hb[FeII]O₂に対してANOVAでP<0.0001)。比較のため、Hb(FeIII)の収縮特性を示す(□)；各データポイントにつきn=6~17。

方法

この血管環バイオアッセイの詳細は公表されている(Stamler, J.S.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:444-448(1992))。SNO-Hb(FeII)O₂調製品は、Hb(FeII)O₂タンパク質に対して10倍過剰のS-ニトロソシステイン(CYSNO)を使用して合成(2%ホウ酸、0.5mM EDTA、約15分保温)した後、セファデックスG-25カラムを通して脱塩を行なった。CYSNOは、0.5N HC1、0.5mM EDTA中で合成した後、0.5mMのEDTAを含む1Mリン酸緩衝液中で中和(1:1)した。SNO-Hb(FeII)I調製品は同様の手法で、ただしHb(FeIII)を出発物質として、調製した。後者はHb(FeII)O₂を過剰のフェリシアン化物で処理した後、G-25カラムに通して脱塩することにより合成した。SNO-Hb濃度は分光法で確認し、S-ニトロソチオール含量はSavilleの方法(Stamler, J.S.ら, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 8

9:444-448(1992) によって決定した。S-N0／四量体化学量論は、どちらのS-N0-Hb調製品についても約2 だった。ヘムの酸化はuv- 分光測光法では検出不可能だった。

B. グルタチオンによるS-N0-Hb作用の増強

バイオアッセイ槽にグルタチオン (100 μ M) を添加すると、S-N0-Hb (FeII) O₂ (■) とS-N0-Hb (FeIII) (●)に対する用量- 応答が共に増強される (図4B参照。
 $n = 6 \sim 12$; a の各軌跡と比較してどちらの場合もANOVAにより $p < 0.0001$) 。グルタチオンは、いくつかの実験で基礎緊張に対して一時的な影響を持ち、Hb (FeII) O₂ (▲)に対する応答には有意な影響を与えたなかった。

C. S-N0-Hbとグルタチオンの間のニトロソ基交換

S-N0-Hb (100 μ M) からグルタチオン (10mM) へのN0基転移の速度を、S-N0-Hb (FeII) O₂ (オキシ) とS-N0-Hb (FeIII) (メト) について示す ($n = 5$) 。データは、出発S-N0-Hb濃度に対する生成したGSN0の量として表わしてある。この転移は、S-N0-Hb (FeII) O₂ よりもS-N0-Hb (FeIII) の場合の方が速く (ANOVAにより $p < 0.002$) 、GSN0/S-N0-Hb 平衡がメトHbの生成によりGSN0側にシフトすることが示唆される。

方法

GSN0が生成するチオール/S-N0-Hb 交換は、トリクロロ酢酸沈殿後にしたがって、化学的に立証された (Stamler, J.S. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:44-448(1992)) ($n = 5$) 。これらの結果は、別個の実験で、反応混合物をG-25カラムに通して分離した後、残存するS-N0-Hb濃度を測定することによって検証した。

D. 赤血球によるS-ニトロソチオール種の輸出

S-N0-Hbを含有するヒト赤血球が、経時的に低分子量RSN0種を輸出することを示している。溶血は、1時間で0～<0.5%の範囲にあって、RSN0放出速度とは相関せず、測定された細胞外RSN0のごく一部の原因にしかならなかった。

方法

遠心分離によって保存用ヒト赤血球を得、洗浄し、5mM SNOCYSを含むリン酸緩

衝食塩水 (0.5mM EDTA, pH7.4) 中に1時間再懸濁した。これにより、0.5 S-N0 /四量体の化学量論を持つSNO-Hb (FeII0₂/FeIII混合物) を含む赤血球調製品が得られる。次に、その赤血球を繰返し洗浄することにより、残存するCYSN0を除

去し（確認した）、その赤血球をクレブス溶液中 (1:4) でインキュベートした。細胞外RSN0の蓄積を、Saville の方法 (Saville, B., Analyst, 83:670-672 (1958)) で経時的に測定した。遠心分離の後、赤血球上清を分光法で分析することにより、溶血を測定した。

実施例5 : in vivo でのSNO-Hb生理活性

無細胞Hbの全身投与は、高血圧応答をもたらすが、これはNOがヘムによって捕捉されるからであるとされている (Vogel, W.M. ら, Am J. Physiol., 251:H413-H420(1986); Olsen, S.B. ら, Circulation, 93:329-332(1996))。SNO-Hbがこの有害な影響を持たないかどうかを決定するため、また、NO放出のin vitro機構が in vivo環境にも及ぶかどうかを調べるため、麻酔したラットの大腿静脈にボーラスとして注入したHbとSNO-Hbに対する応答を比較した。図5に示すように、Hb (FeII) O₂ (200nmol/kg) は、平均動脈圧に20±3mmHg の上昇をもたらした (n = 4; P < 0.05)。これに対して、SNO-Hb (FeII) O₂ は、高血圧作用を示さず、SNO-Hb (FeIII) は、低血圧応答を引き出した（図5）。したがって、これらの化合物の in vivoでの特性は、in vitroで認められたもの（図4A）とよく似ている。さらに、赤血球の生理学的応答が無細胞Hb調製品と同等であることを立証するために、SNO-Hbを含有する赤血球を、L-NMMA (50mg/kg) で予備処置して内因性RSN0種を枯渇させたラットの大腿静脈に注射した。正常なラットに認められるレベルと同等なSNO-Hbレベル (0.1 ~ 0.5 μM) で、SNO-Hb含有赤血球は、低血圧応答を引き出しが (8 ± 1mmHg ; 平均±SEM ; n = 9)、天然 (SNO-Hb枯渇) 赤血球はそのような応答を引き出さなかった (P = 0.001)。これら約10% の平均血圧変化は、人間の高血圧と正常血圧を区別する変化にはほぼ相当し、いくつかの抗高血圧治療の治療範囲内にある。HbとSNO-Hbの効果はいずれも（無細胞であるか、赤血球内に含まれるかにかかわらず）一過性であり、このことは、HbのS-ニトロシル化とSNO-Hbの代謝が in vivoで起こって、それが血圧の復旧をも

たらしていることを示唆している。S-NO／ヘム化学量論がほぼ1:50,000である血液中でのSNO-Hbの生理活性は、Hb (Fe) 不活化に対するこのNO関連活性の抵抗性の劇的な実例である。

無細胞HbとSNO-Hbの in vivo効果

スプレーグ・ドーリーラットの大腿静脈に2～200nmol/kgのHb (FeII) O₂を（ボーラスとして）投与すると、平均動脈圧が用量依存的に上昇することが示される。200nmol/kgでは、平均動脈圧が25mmHg (20±3mmHg ; n = 4 ; P < 0.05) 上昇した。血圧の上昇は、10～15分以内に反転した。（同じ用量範囲での）SNO-Hb (FeII) O₂注入は、明白な血圧変化を引き起こさず、Hb (FeII) O₂によって誘発される高血圧を改善することが示される。より高い投与量でも、同様の応答が認められた。これに対し、SNO-Hb (FeIII) 注入は、最高投与量 (200nmol/kg) で平均動脈圧の有意な低下（前108 ± 5mmHg；後74±6mmHg , n = 5 ; P < 0.05）を引き起こした。高血圧応答は、一過性の傾向があり、10分間で血圧が正常化した。血圧の減少は、SNO-Hbを含有する赤血球の注射でも認められた。

方法

ラットをペントバルビタールの腹膜内注射によって麻酔し、局所切開により、大腿動脈と大腿静脈を確保した。次に、動脈にカニューレを挿入し、Gould 記録計を取り付けたViggo Spectramed圧力変換器を用いて、血圧を連続的に監視した。データの取得にはIBM PC (DATA Q Codas) を使用した。

実施例6：S-ニトロソチオール種の赤血球への負荷

ラット赤血球をS-ニトロソシスティン（ヘム (5mM) に対して等モル；リン酸緩衝液pH7.4 , 25°C）と共にインキュベートすると、細胞内S-ニトロソチオール種の迅速な生成が起こる。メトHbは迅速には生成しない。細胞内容物をG-25カラムに通して分離すると、赤血球内低分子量S-ニトロソチオール、例えばS-ニトロソグルタチオン (GSNO) の生成が確認される。2分までに、mM程度のGSNOを得ることができる。

RSNOのアッセイ法

S-ニトロソシスティン (5mM) 处理した赤血球を遠心分離によりすばやくペ

レット化し、3回洗浄し、4℃の脱イオン水中で溶解し、その細胞質画分をG-25カラムに通してすばやく脱塩する。細胞内RSNOはSavilleの方法で測定し、分光法で確認することができる。

負荷赤血球からの血圧に対する効果

(SNO-RBC を調製するために) S-ニトロソシステイン (S-nitroscysteine) で処理し、スプレーグ・ドーリーラットの大腿静脈に導入した赤血球は、用量依存的に平均動脈圧を低下させた。SNO-Hbが0.3 μM (内因性 *in vivo* SNO-Hb濃度) でアッセイされた赤血球の場合、動脈圧は8 ± 1mmHg (9回の実験に関する平均±SEM ; 非処置赤血球対照と比較して p < 0.001) 低下した。SNO-Hbで0.5 μM と測定された赤血球の場合、動脈圧が10mmHg 低下した。SNO-Hbが0.1 μM (内因性SNO-Hb濃度未満) で測定された赤血球の場合には、動脈圧が6mmHg 低下した。非処置赤血球の投与は、動脈血圧に何の効果も持たないか、もしくはわずかに上昇させた。L-モノメチル-L-アルギニン (L-NMMA ; 50mg/kg) の投与は、約20mmHg の血圧上昇を引き起こした。負荷赤血球のボーラス投与による血圧の変化は、15 ~20分間持続した。

その他の方法

ラットをペントバルビタールの腹膜内注射によって麻酔し、局所切開により大腿動脈と大腿静脈を確保した。次に、動脈にカニューレを挿入し、Gould記録計

を取り付けたViggo Spectramed圧力変換器を用いて、血圧を連続的に監視した。

データの取得にはIBM PC (DATA Q Codas) を使用した。

実施例7：冠状動脈血管拡張、冠状動脈流および血圧に対するSNO-Hbの効果

SNO-Hbを実施例4Aに記述したように合成した。反応の完了は、実施例4Aに記載のように決定した。24頭の健康な雑種犬 (25~30kg) を静脈内チアミラルナトリウム (60~80mg/kg) で麻酔し、第4肋間腔に左開胸術を施した。左過剰耳より遠位の左回旋冠状動脈を最小限切開した。一対の7-MHz 圧電性結晶 (1.5 × 2.5mm, 15~20mg) をダクロン裏材に取り付け、切開した血管部分の反対側表面の動脈血管外膜を 6-0プロレンで縫合した。オシロスコープ監視とオンライン音波測微法 (ソノミクロメーター120-2、Triton Technology, カリフォルニア州サンデ

イエゴ) を用いて、適切な結晶位置を確保した。パルスドップラー流量プローブ(10MHz、加圧帶型)を結晶より遠位に埋め込んだ。膨張型気球閉塞具も流量プローブより遠位に設置した。結晶と閉塞具の間にある回旋動脈の全ての分岐を結紮した。ヘパリンナトリウム充填ポリビニルカテーテルを、尖から左心室腔内に、過剰耳から左心房に、左内胸動脈から上行大動脈に挿入した。カテーテル、管および線材は、首の付け根にある皮下囊までくぐらせた。

10~15日の回復期間後に、カテーテルと線材を全身麻酔下に体外に出し、2~3日後に、各犬にSNO-Hb (0.4mg) のボーラス注射を与えて血管応答を評価した。5%未満の心外膜冠状血管拡張を示した2頭の犬を以降の試験から除外し、別の技術的理由で2頭を除外した。

犬を緩く拘束して外側横臥位に目をさましたまま横たわらせながら、調教し、研究した。実験室は薄暗く照明し、静かに保った。大動脈圧、左心室端-拡張期圧dP/dt、冠状動脈外径および冠状動脈流を連続的に監視した。10頭に、0.1mlのSNO-Hb溶液 (50nM/kg) を左心房カテーテルから注射した。脈管構造に対する溶媒の潜在効果を確かめるために、蒸留水中の30% エタノール0.1ml を賦形剤対

照として与えた。注射の間に、位相性冠状血流 (phasic coronary blood flow) と冠状動脈直径を注射前のレベルに戻らせた (最低15分間)。注射間に15分の間隔を置くと、反復注射に変化が起こらなかった。コンダクタンス血管 (conductance vessels) に対するSNO-Hbの直接的血管拡張効果と潜在的な流量媒介性の間接的血管拡張効果を評価するため、冠状血流が注射前のレベルかそれよりわずかに低く維持されるように可調式閉塞具を一部膨張させながら、10頭中6頭に投与を繰返した。塩化アセチルコリン (Sigma Chemical) に対する応答を、SNO-Hbの場合と同様の操作を行なった後、10頭の別の群で評価した。

心外膜冠状動脈直径、冠状血管流、心拍数、大動脈および左心室端-診断圧(diagnostic pressure)を各SNO-Hb注射の前後で比較した。冠状動脈寸法と血流の最大変化を、増大するSNO-Hb投与量の関数として表した。増大する投与量に対する冠状動脈寸法の応答は、下記の等式で記述しうる独特なS字型用量-応答曲線に従った：

$$\text{効果} = \frac{\text{最大効果} \times \text{投与量}}{K_D + \text{投与量}}$$

[式中、 K_D は薬物-受容体複合体解離定数であり、最大応答の50%が達成される投与量 (EC_{50})である]。各動物で、その用量-応答曲線に対して非線型最小二乗回帰 ($r^2 > 0.90$)を行なった。この回帰は上記の等式に束縛された。回帰から、個々の動物それぞれに対して、最大応答値と K_D 値が得られた。次に、これらの値の平均値を計算し、各試験群について平均 K_D と最大応答を得た。これらの値を用いて平均曲線を作成し、平均用量-応答値と共にプロットした（図6A～6Fを参照のこと）。

実施例8：血液におけるS-ニトロソヘモグロビンとニトロシル(FeII)-ヘモグロビンの内因性レベル

SNO-Hbが血液中に天然に存在するかどうか、また天然に存在するならば、その

O_2 輸送能との関係および赤血球のニトロシル化ヘム含量を決定するために、赤血球のS-ニトロソチオールおよびニトロシル-ヘム含量をアッセイするための分析法を開発した（表2）。麻酔したラットの左心室から直接穿刺によって動脈血を得、頸静脈（jugular vein）と下大静脈から静脈血を得た。次に、赤血球からHbを精製し、RSNO含量と(FeII) NO含量を測定した。動脈血には有意なレベルのSNO-Hbが含まれていたが、静脈血では実質上検出できなかった（表2）。NOシンターゼ阻害因子N^ω-モノメチル-L-アルギニン(L-NMMA)を注入（50mg/kg）した45分後に行なった測定は、SNO-Hbと総Hb-NOの枯渇を示した（それぞれ82および52±18%；n=3～5；p<0.05）。これらのデータは、多少の環境的寄与は排除されないものの、SNO-Hbの内因性起源を確立するものである。SNO-Hbについて認められた動脈-静脈分布は、Hb(FeII) NOの場合は逆転し、Hb(FeII) NOは、部分的に脱酸素化された（静脈）赤血球中に、より高い濃度で検出される（図2）。したがって、ニトロシル化されたタンパク質チオールとヘムの比率は、血液の酸素化状態に依存するようである。これらの発見と一致して、Wennmalmとその共同研究者らは、Hb(FeII) NOが主として静脈（部分的に脱酸素化された）血液中で生成することを示している（Wennmalm, A.ら, Br. J. Pharmacol., 10

6(3):507-508(1992))。しかし、Hb (FeII) NOの *in vivo* レベルは、一般的には低すぎて (EPR で) 検出することができず、SNO-HbはEPR サイレントである (すなわち常磁性でない)。したがって、光分解- 化学発光法は、重要な技術的進歩を意味する。というのは、これが、正常な生理学的条件でHbに対するNO結合を定量的かつ機能的に評価することができる最初の方法論だからである。

方法

麻酔したスプレーグ・ドーリーラットの左心室（動脈血）および頸静脈（静脈血）から血液を得た。同等の静脈値は下大静脈由来の血液中にも得られた。赤血球細胞を800gで遠心分離することによって単離し、4°Cのリン酸緩衝食塩水中で

3回洗浄し、0.5mM EDTAを含む脱イオン水4倍量を添加することにより溶解し、Penefskyの方法に従って4°Cで、G-25カラムにすばやく通して脱塩した。24匹のラットで、Hb試料を2等分した後、それらを、Bradfordの方法で測定したタンパク質濃度に対して10倍過剰量のHgCl₂で処理し、もしくは処理しなかった。SNO-HbとHb (FeII) NOの測定は、下記の光分解- 化学発光法によって行なった。さらに12匹のラットで、HgCl₂処理後に亜硝酸塩をアッセイすることにより、SNO-Hbの存在をさらに確認した。具体的に述べると、試料 (HgCl₂を含むものと含まないもの) を4°Cで1時間、Amicon-3 (セントリコンフィルター、分子量カットオフ3,000) に通して分離し、低分子量画分を0.5N HCl中の1 μM グルタチオンを含む気密シリンジに集めた。これらの条件下で、存在する亜硝酸塩はすべて、S-ニトロソグルタチオンに変換され、それを光分解- 化学発光法で測定した（検出限界約1nM）。SNO-Hbはすべての動脈試料中に存在し、この方法で決定されたレベル (286 ± 33nM) は実質上同一で、表2に示すレベルと統計学的に相違しなかった。静脈血では、SNO-Hbが検出不能 (0.00 ± 25nM) で、そのレベルは上記のレベルと統計学的に相違しなかった。

S-ニトロソヘモグロビンのアッセイ法

高感度な光分解- 化学発光法を使用した。多少類似するアッセイ法が、生物学的系中のRSNO種 (S-ニトロソチオール種) を測定するために使用されている (Gaston, B. ら, (1993); Stamler, J.S. ら, (1992))。この方法では、NOをチオ

ールから光分解的に遊離させ、それをオゾンとの反応により化学発光分光計で検出する。これと同じ操作原理は、ニトロシリ- 金属化合物からのNOの切断（および測定）にも使用できる（Antonini, E. および Brunori, M. Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands, American Elsevier Publishing Co., Inc., ニューヨーク, (1971)の29~31頁）。光分解セル内の流速を調節することにより、Hb (FeII) NOのNOリガンドの完全な光分解を達成することができる。

SNO-Hb、Hb (FeII) NOおよびS-ニトロソグルタチオンの合成調製品から作成した標準曲線は、直線 ($R > 0.99$) で、実質上重ね合せることができ、約1nM の感度限界を示した。2つの分析基準、すなわち 1) SNO-Hbからの信号は、10倍過剰のHgCl₂で試料を予備処理することによって除去されたが、Hb (FeII) NOは、水銀試験に対して耐性であったこと、および2) HgCl₂によるSNO-Hbの処理は（一般的なグリース反応により）定量的な収量で亜硝酸塩を生じるが、Hb (FeII) NOを同様に処理しても亜硝酸塩は生じないことによって、SNO-HbとHb (FeII) NOが確実に識別されることを発見した。UV/VIS分光法により、NOが過剰のHgCl₂の存在下にヘムに結合したままであることが確認された。

実施例9：S-ニトロソヘモグロビンによる血小板凝集の阻害

ヒトHbAoの調製方法は、実施例1の「方法」の段落に記載したものである。SNO-Hb (FeII) O₂の製造方法は、実施例2 Aに記載したものである。SNO-Hb (FeII) O₂の製造方法は、実施例1に記載したものである（実施例1のB、C部分および「方法」参照）。SNO-ヘモグロビンの定量は、Savilleの方法（Saville, B., Analyst, 83:670-672 (1958)）および実施例8の「S-ニトロソヘモグロビンのアッセイ法」に記載されたアッセイにしたがって実施例1のようにした。

少なくとも10日間3. 4 nMのクエン酸ナトリウムで抗凝固された静脈血を、アセチルサリチル酸またはいかなる他の血小板活性剤を消費していないボランティアから得た。血小板に富む血漿を150×gで25°Cで10分間遠心分離して調製し、回収後2時間以内に用いた。血小板数をクールターカウンター（モデルZM）で測定しすると、1. 5~3×10⁸/mlであった。

血小板に富む血漿の凝固を、標準的な比濁計技術で測定したところ、結果が出
血時間と相関していることが示された。血小板のアリコート (0. 3 ml) を 3
7°Cでインキュベートし、PAP-4 搅拌機 (Biodata, Hatsuboro, PA) 中で 1

000 rpmで搅拌した。ヘモグロビンを、血小板と 10 分間プレインキュベー
トし、 $5 \mu M$ ADPで凝集を誘導した。凝集を、光透過率の最大速度および変
化の程度を測定することによって定量し、ヘモグロビンの非存在下で行なった対
照凝集と比較した正規化値として表現した。

凝集アッセイの結果を図7A、7Bおよび7Cに示す。標準偏差を縦棒で示す。SNO-Hb (FeII) O₂は、試験した高濃度での血小板凝集のいくらかの阻害を起こした。
また、SNO-Hb (FeIII) は、 $1 \mu M$ およびそれ以上の濃度で存在すると、SNO-Hb
(FeII) O₂よりもはるかに大きな程度まで、血小板凝集を阻害する。

実施例 10 : c GMPに対するSNO-Hbの効果

血小板に富む血漿 (PRP) をヘモグロビン、SNO-オキシHb、またはS
NO-メトHbのいずれかと 5 分間インキュベートし、その後 0. 5 ml の氷冷
トリクロロ酢酸を 10 %になるまで添加して、アッセイを終了した。上清のエー
テル抽出を行なって、トリクロロ酢酸を除去し、無水酢酸での試料のアセチル化
を用いてアッセイの感度を増加させた。サイクリックGMPの測定をラジオイム
ノアッセイによって行った (Stamler, J. S. ら、Circ. Res. 65:789-795(1989)
)。

結果を図8に示す。試験したHbの全濃度について (1, 10 および $100 \mu M$) 、SNO-Hb (FeIII) について測定したc GMPの濃度は、天然Hbのものよ
り小さかった。

実施例 11 : Hbのポリニトロソ化

A. HbAo (オキシ) を、S-ニトロソグルタチオン/HbAoの比が 6. 25 で S
-ニトロソグルタチオンと、pH 7. 4 で 25°Cで 240 分間インキュベートし
、セファデックスG-25カラムで脱塩した。亜ジチオン酸塩存在下 (スペクト
ルB、図9A) および非存在下 (スペクトルA、図9A) でスペクトル測定を行なっ

た。スペクトルにおけるシフトは、四量体あたり2個のSNO基であることを示す。

B. HbA₀を、蛋白質に対して100倍過剰量のS-ニトロソグルタチオンと、pH 9.2で240分間インキュベートした後、G-25カラムで脱塩した。次に、一部を亜ジチオニ酸塩で処理した。図9Bのスペクトルは、Hbが複数の部位でニトロソ化されていることを示す。

C. HbA₀を、四量体に対して100倍過剰量のS-ニトロソシステインと、pH 7.4で25℃で5~20分間インキュベートした。種々の時間の処理後、蛋白質をG-25カラムで脱塩し、亜ジチオニ酸塩で処理した。スペクトルは、時間とともにHbのポリニトロソ化が進むことを示している（図9CのスペクトルA~F）。100倍過剰量のS-ニトロソシステインとの処理の5分後、四量体あたり0.09個のNO基が付加されていた（図9CのスペクトルA）；20分後、少なくとも4個のNO基が付加されていた（図9CのスペクトルF）。中間点で、四量体あたり0.4個のNO基（図9CのスペクトルB）、1.58個のNO基（図9CのスペクトルC）、2.75個のNO基（図9CのスペクトルD）、2.82個のNO基（図9CのスペクトルE）が付加されていた。

D. ラットHbを、四量体に対して100倍過剰量のS-ニトロソグルタチオンと、pH 7.4で3時間インキュベートした。次に、蛋白質をG-25カラムを通して脱塩した。脱塩した蛋白質の一部を亜ジチオニ酸塩で処理した（図9DのスペクトルB；スペクトルAの蛋白質を亜ジチオニ酸塩で未処理にしておいた。）。図9DのスペクトルBは、RNO_s/Hbの比が6であることを示す。

E. 時間でHbA₀をのニトロソ化の程度をトラッキングしたタイムコース実験を行なった（図9E）。HbA₀の処理を、10倍過剰量のS-ニトロソシステインとpH 7.4で25℃で、または同じ条件下で100倍過剰量のS-ニトロソシステインと行なった。SNOおよびNOの分析をSaville の方法およびJia, L. ら, Nature 380:221-226 (1996) によって行なった。これらの条件下で、ヘムは、極度に酸化された；速度は時間に依存した。

10倍過剰量のS-ニトロソシステインでの処理は、HbA₀の2つの反応性シス

テイン残基のチオール基のみをニトロシル化する。イノシトール6リン酸は、アロステリック平衡をT構造（通常デオキシ型）側にシフトさせることが知られている。100倍過剰量のS-ニトロソシスティンでの処理は、さらなる基をニトロソ化する；つまり、産物は、四量体あたり2個以上のNO基を有する。

実施例12：血液流におけるSNO-Hb(FeII)O₂の効果

SNO-Hb(FeII)O₂は、SNO/Hbの比が2であり、S-ニトロソチオールとの反応によって(HbA₀から)調製される。21%の酸素を呼吸するラットを、図10（白丸、SNO-Hb(100nmol/kg)；黒丸、SNO-Hb(1000nmol/kg)；黒四角、非修飾Hb(1000nmol/kg)）に示すようにHbA₀から調製したHbで注射した。各実験あたり3匹のラットを用いた。血液流をH₂クリアランス法を用いて脳において測定した；微小電極を脳の定位に置いた。付随したPO₂測定は、組織PO₂が20であることを示した。したがって、SNO-Hbは、正常の生理条件下での脳への血液流を改善し、一方、天然Hbは、血液流を減少させた。NO基放出は、局所組織酸素低下によって促進された。

実施例13：ウサギ大動脈の張力におけるSNO-Hb(FeII)O₂、SNO-Hb(FeIII)および(NO)_x-Hb(FeIII)の効果

ヘモグロビンを、Hb四量体に対して1:1、10:1または100:1いず

れかのS-ニトロソシスティンで1時間処理し、実施例4のように進めた。1:1および10:1過剰で行なった反応の産物を、Saville アッセイおよび標準的な分光光学的方法によってアッセイした。1:1の比で行なった反応の産物は、SNO-Hb(Fe)O₂であり、SNO-Hb(FeIII)は、CYSNO/四量体が10:1過剰での反応のうちにみられた。

大動脈環バイオアッセイを、実施例4に記載のように行なった。CYSNO/Hb四量体が100:1の比を用いた反応の産物は、ヘムに付着したNOならびに2個のSNOを含んでいた。100:1のCYSNO/Hb産物の能力は、SNO-Hb(FeIII)のものよりはるかに優れており、ポリニトロシル化を示している（図11参照）。

表2

血中S-ニトロソヘモグロビンとニトロシル(Fe II)ヘモグロビン
の内因性レベル

部位	SNO-Hb (nM)	Hb (Fe II) NO (nM)
動脈	311 ± 55 *	536 ± 99 †
静脈	32 ± 14	894 ± 126

* $P < 0.05$ 静脈に対する；

† $P < 0.05$ 静脈に対する1組の試料に対して

均等物

当業者であれば、単なる日常的な実験により、本明細書に記載されている本発

明の特定の態様に対して多くの均等物を認識するか、または確認することができ
るであろう。そのようなおよび他のすべての均等物は、以下の請求の範囲に含ま
れるものとする。

【図1】

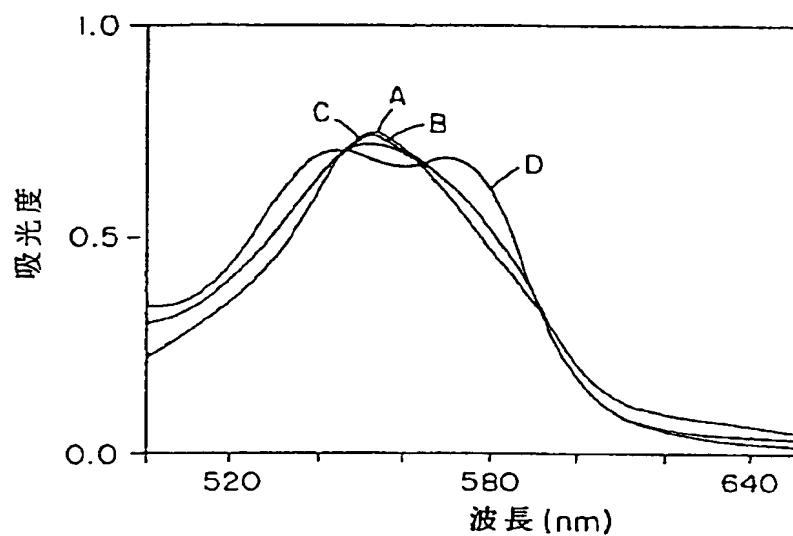


FIG. IA

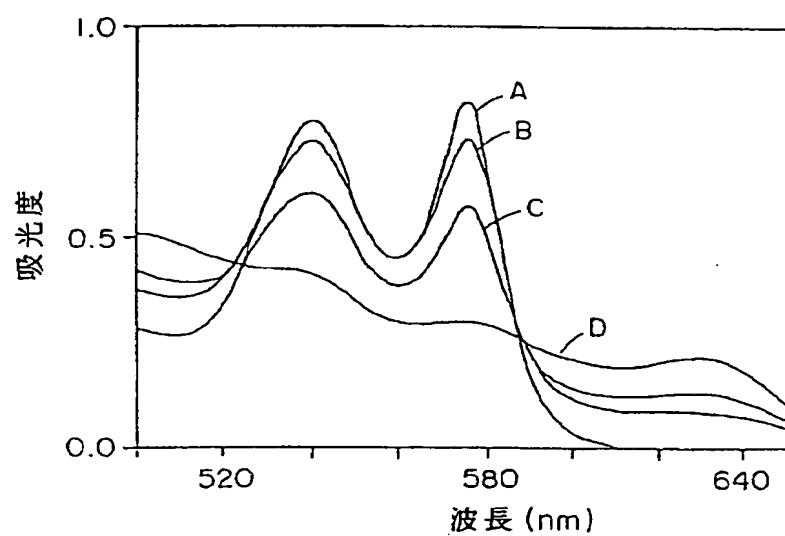


FIG. IB

【図1】

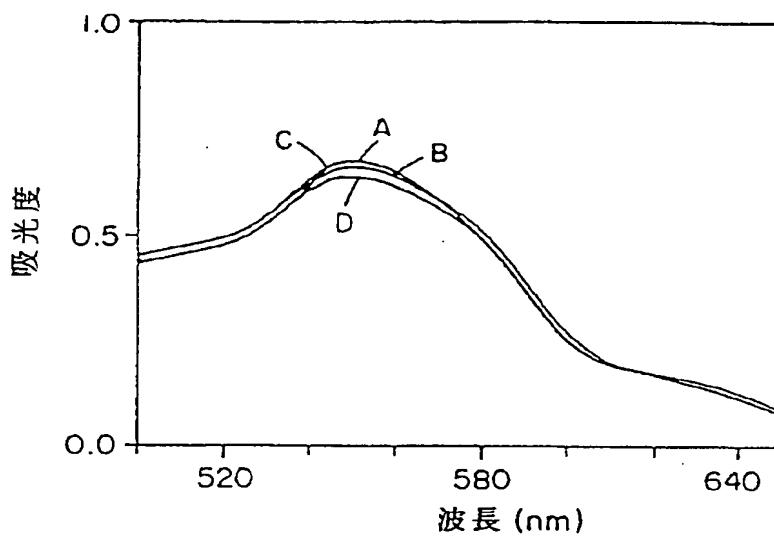


FIG. IC

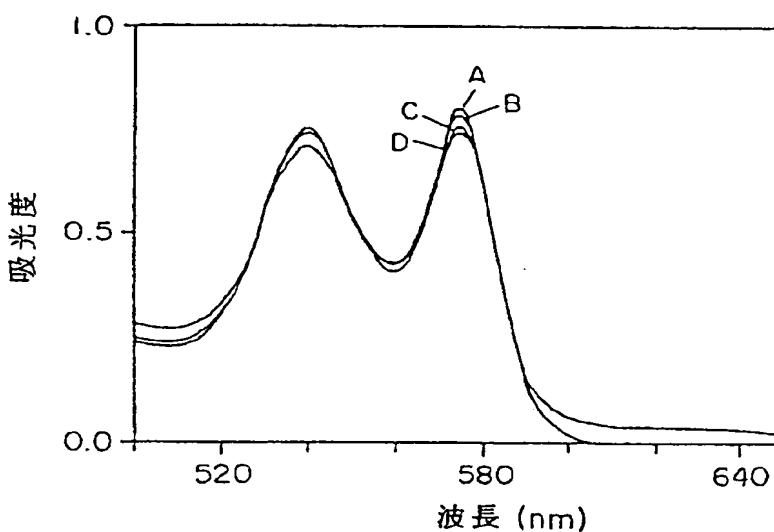


FIG. ID

【図2】

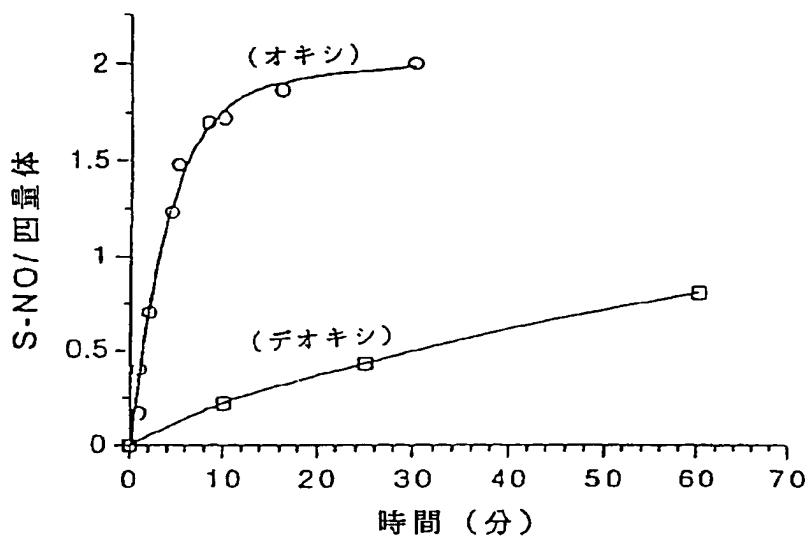


FIG. 2A

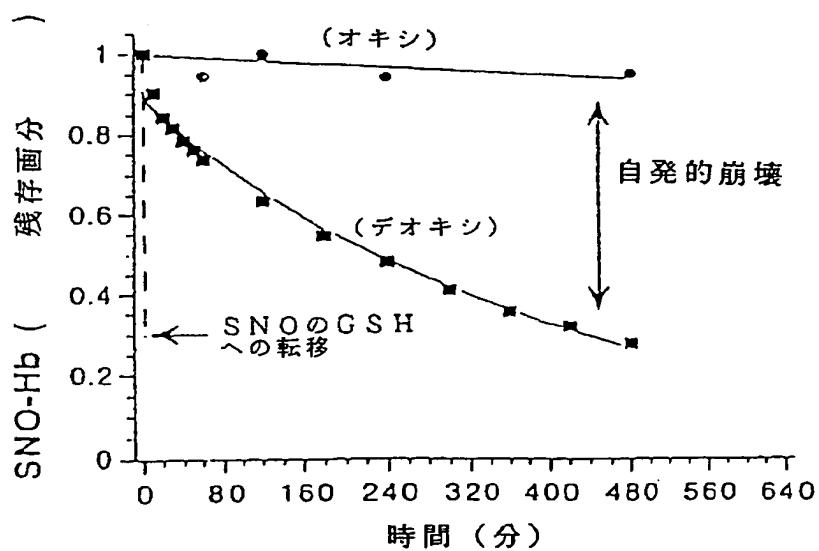


FIG. 2B

【図3】

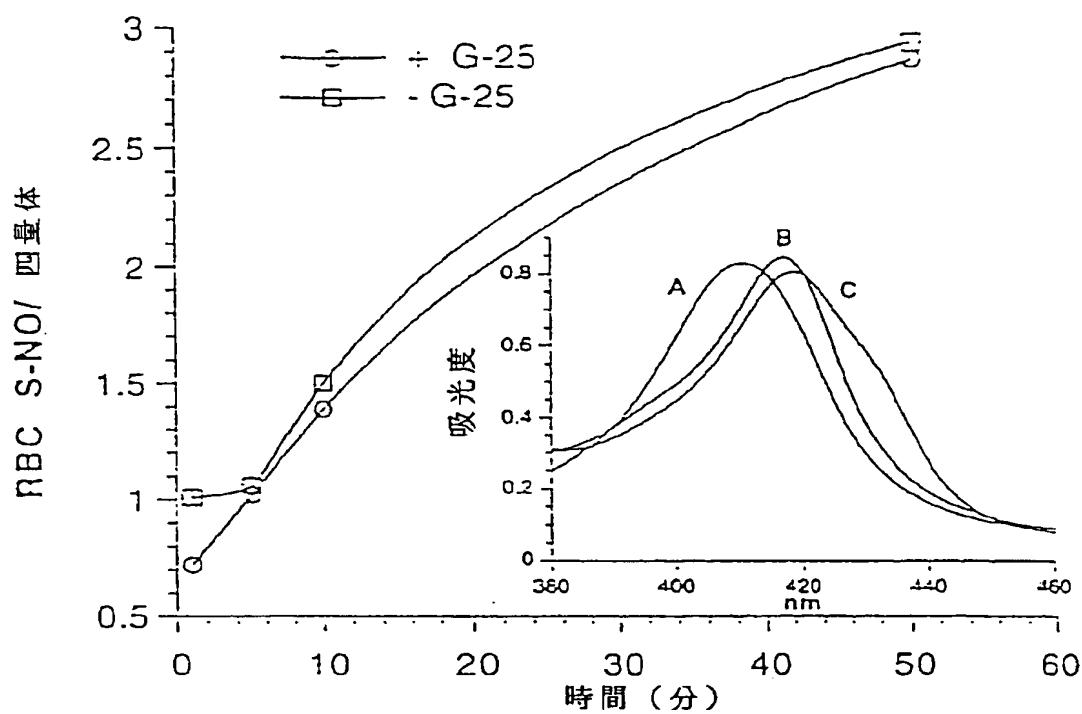


FIG. 3A

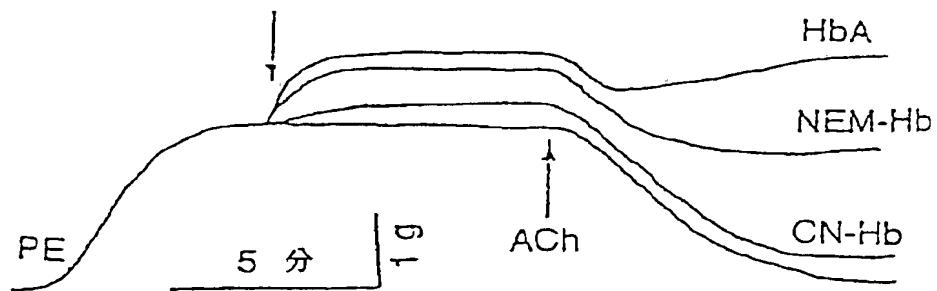


FIG. 3B

【図4】

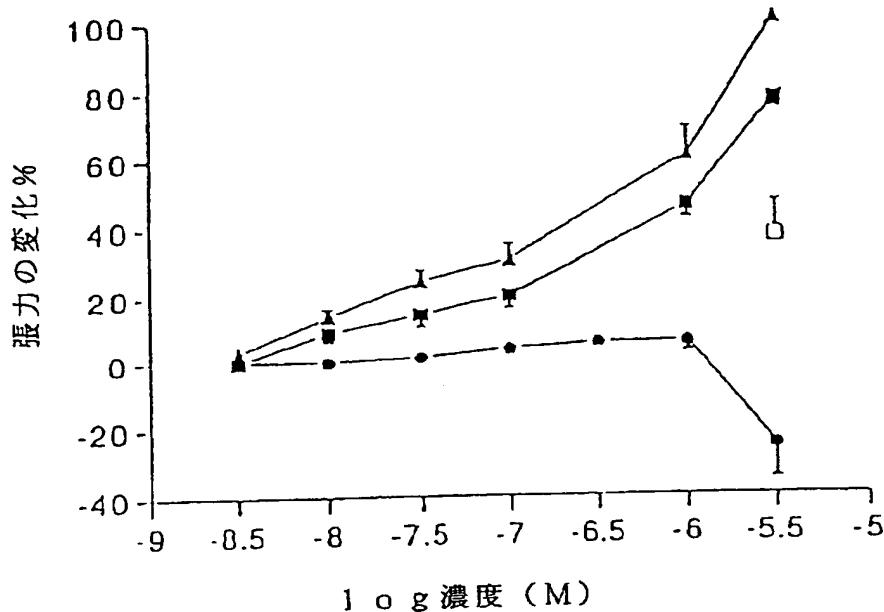


FIG. 4A

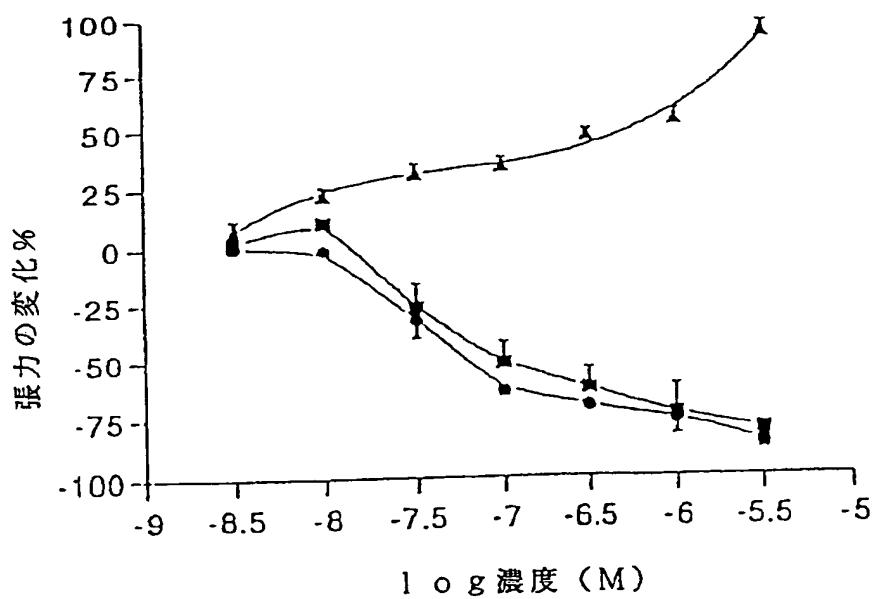


FIG. 4B

【図4】

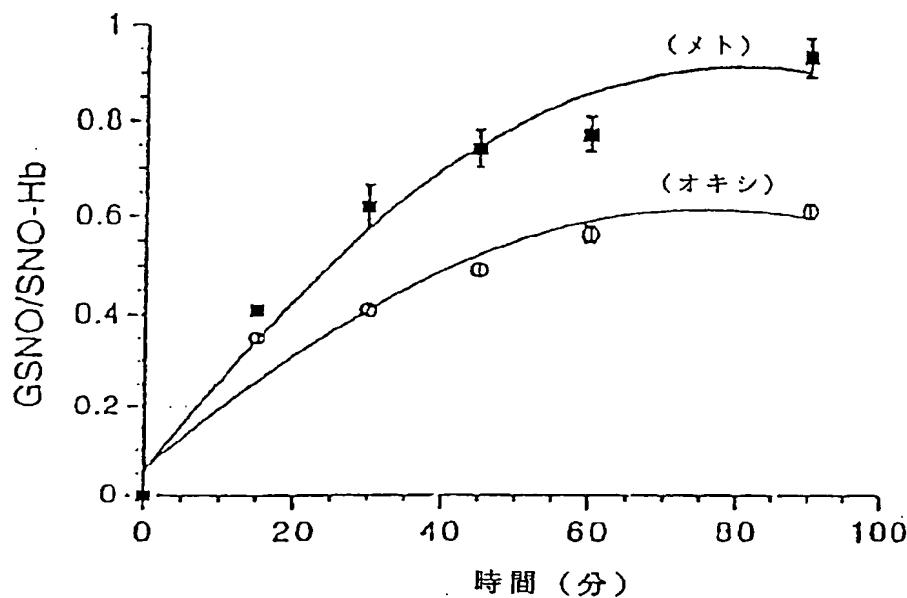


FIG. 4C

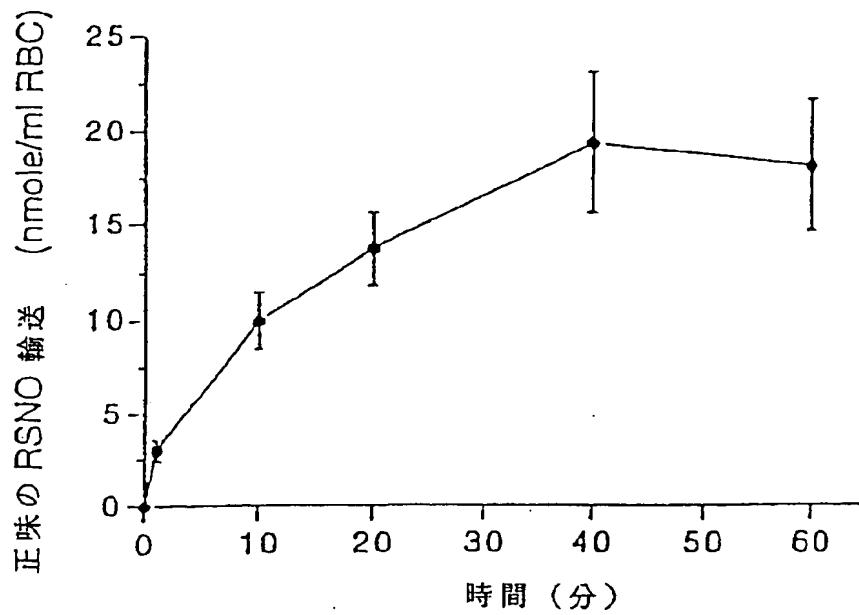


FIG. 4D

[図5]

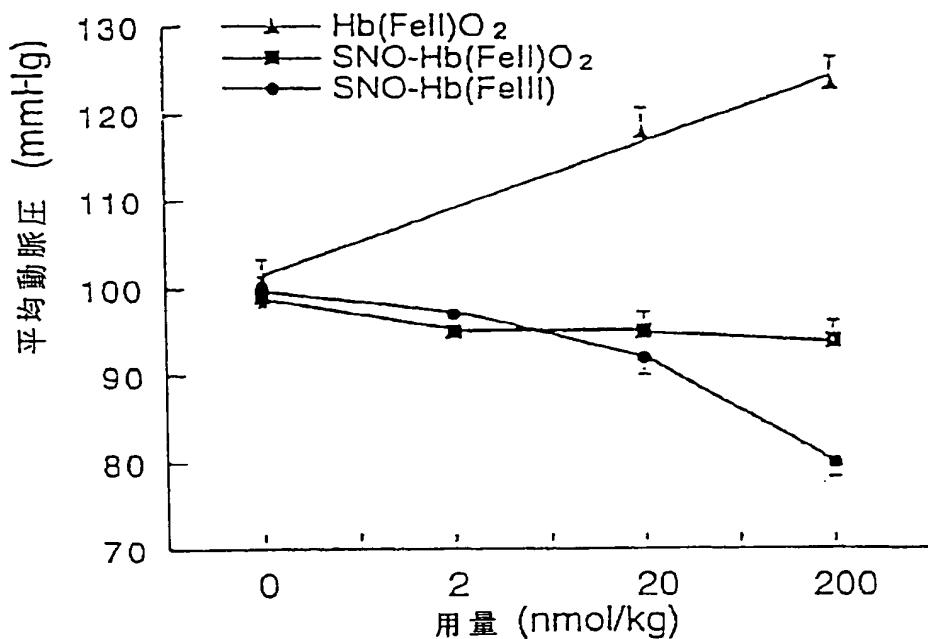
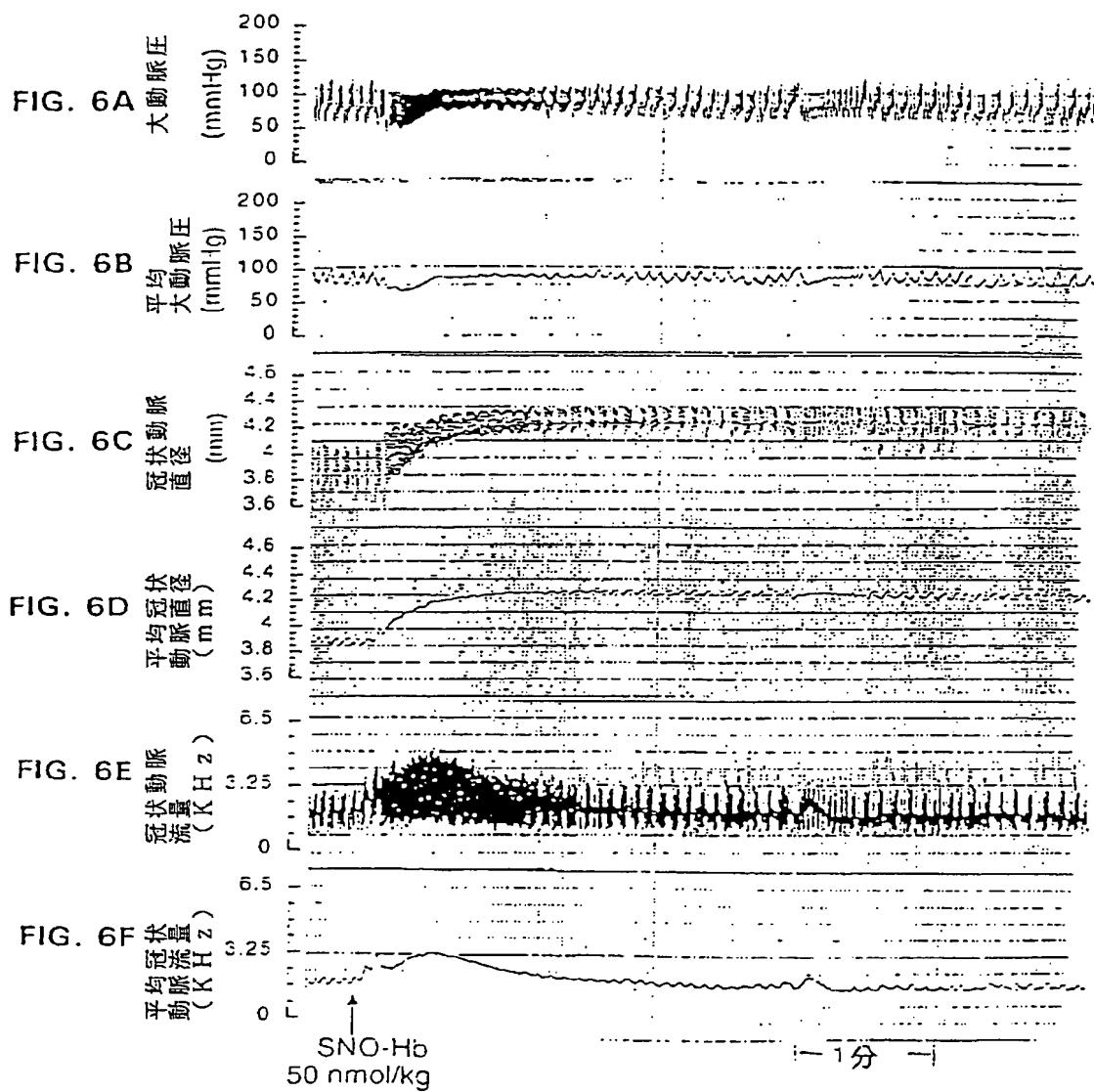


FIG. 5

[図6]



【図7】

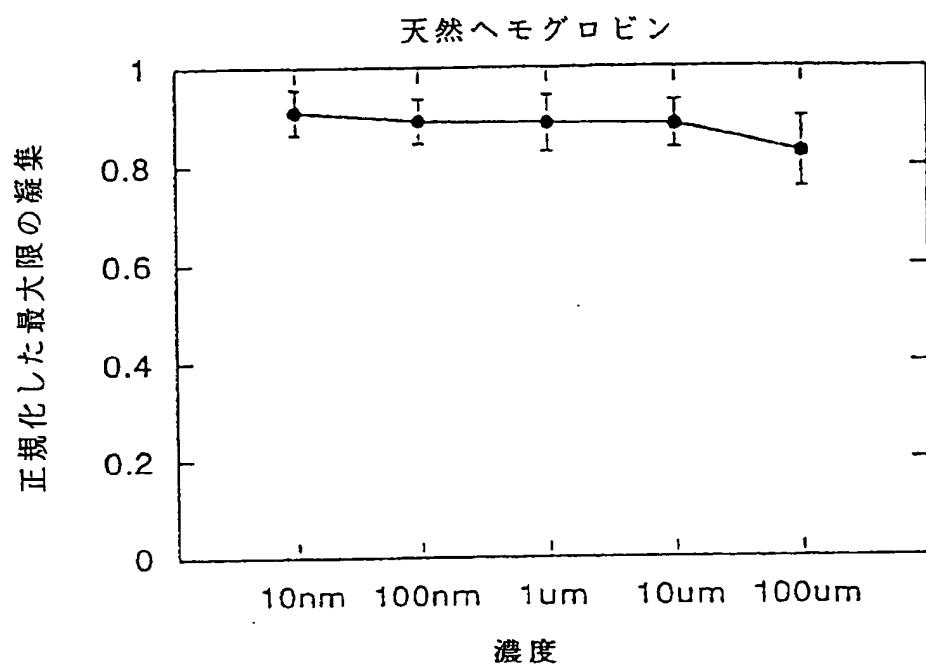


FIG. 7A

[図7]

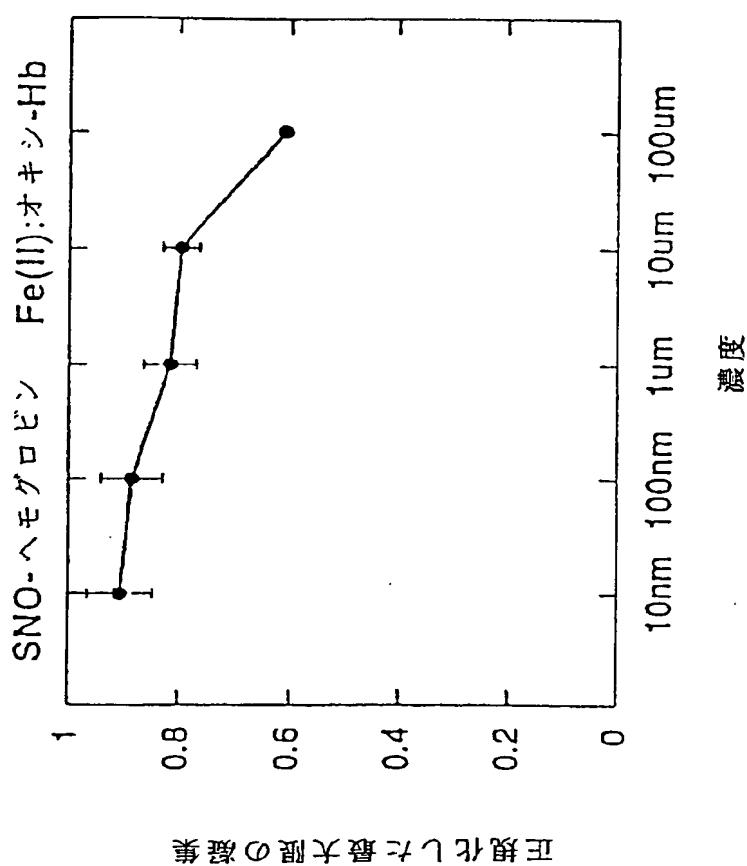


FIG. 7B

【図7】

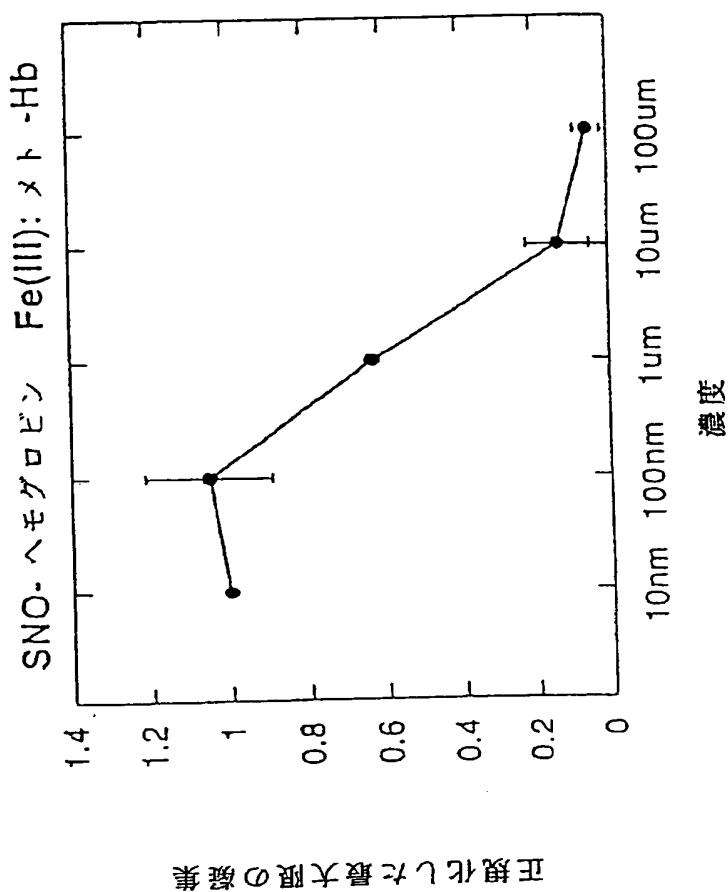


FIG. 7C

【図8】

種々の型のヘモグロビン影響下の(cGMP)

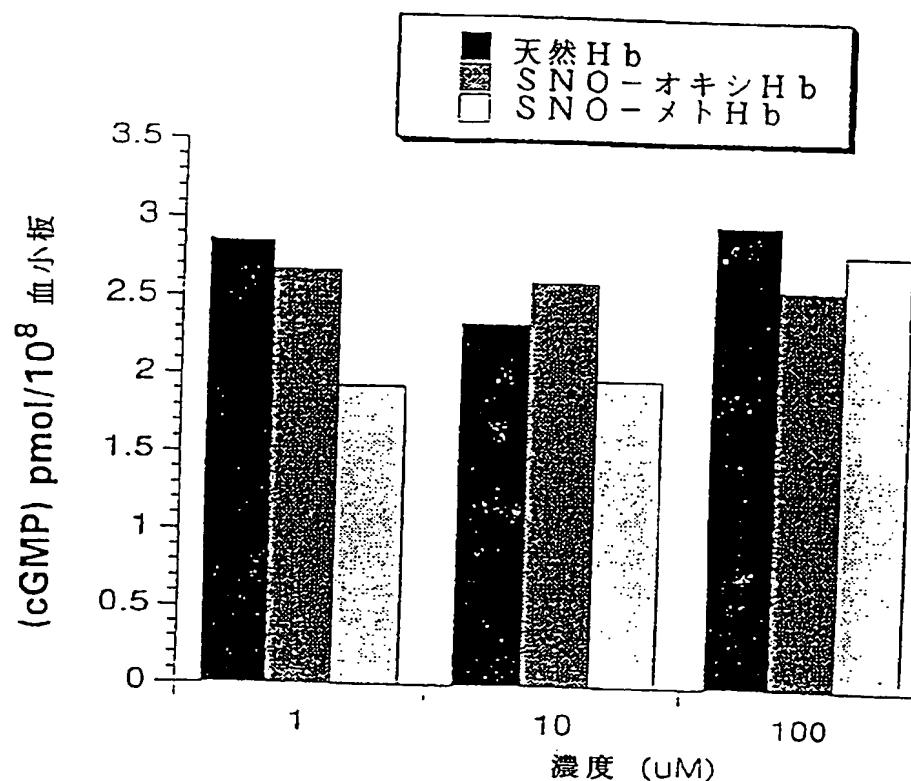


FIG. 8

【図9】

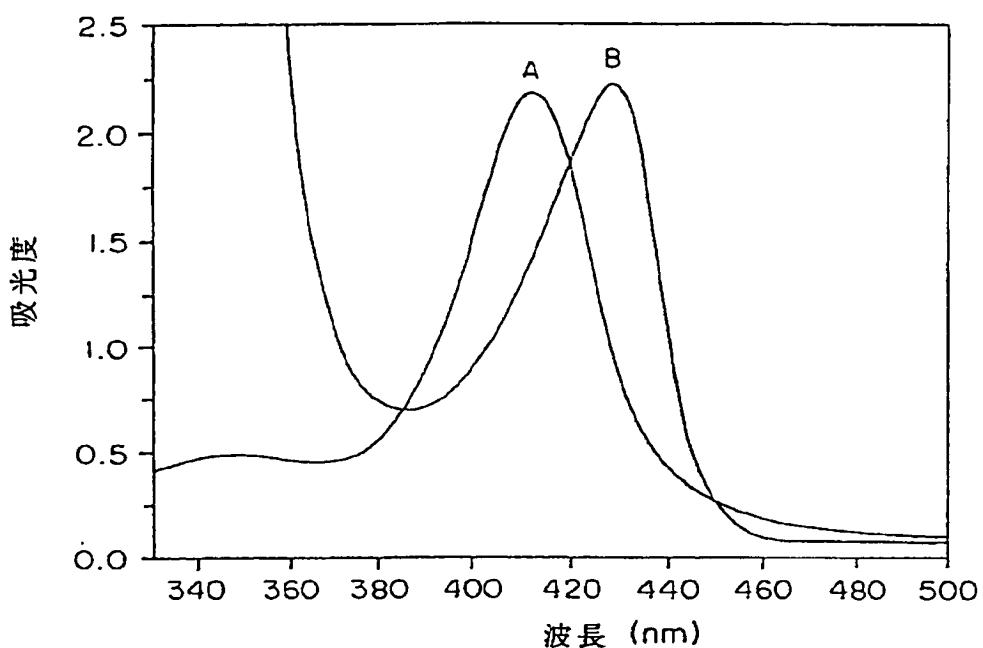


FIG. 9A

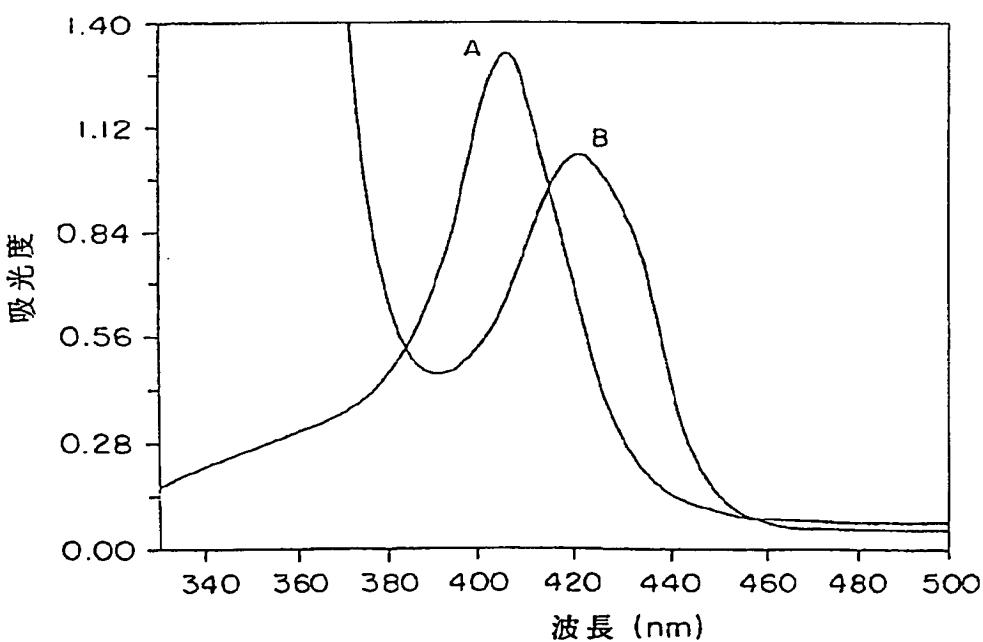


FIG. 9B

【図9】

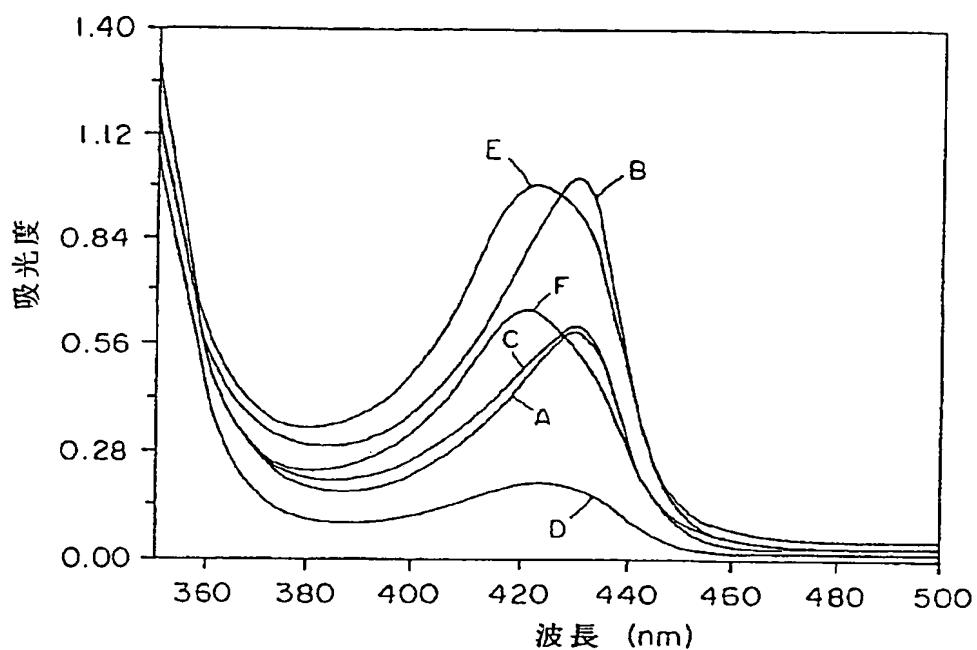


FIG. 9C

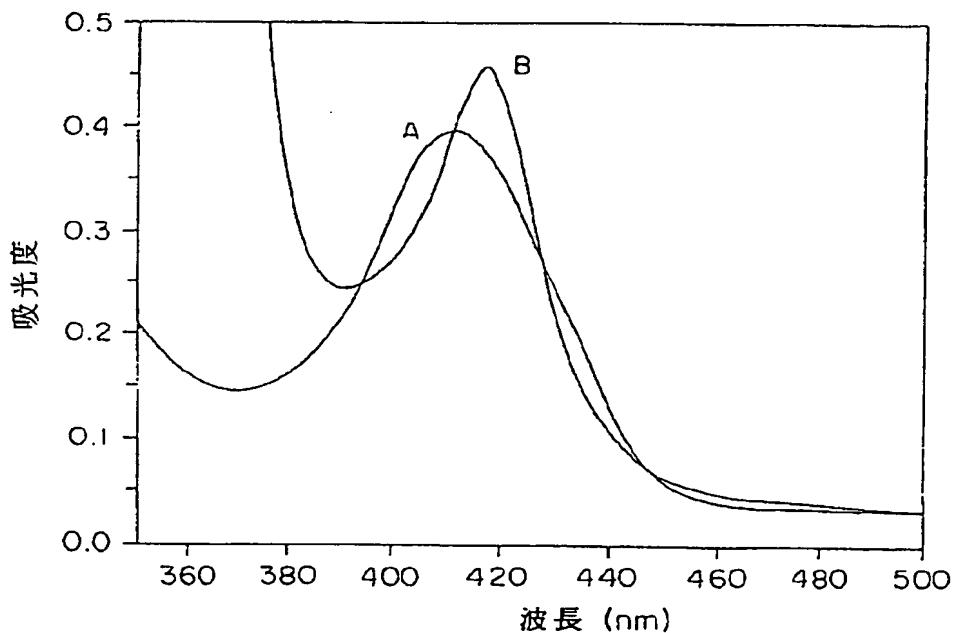


FIG. 9D

【図9】

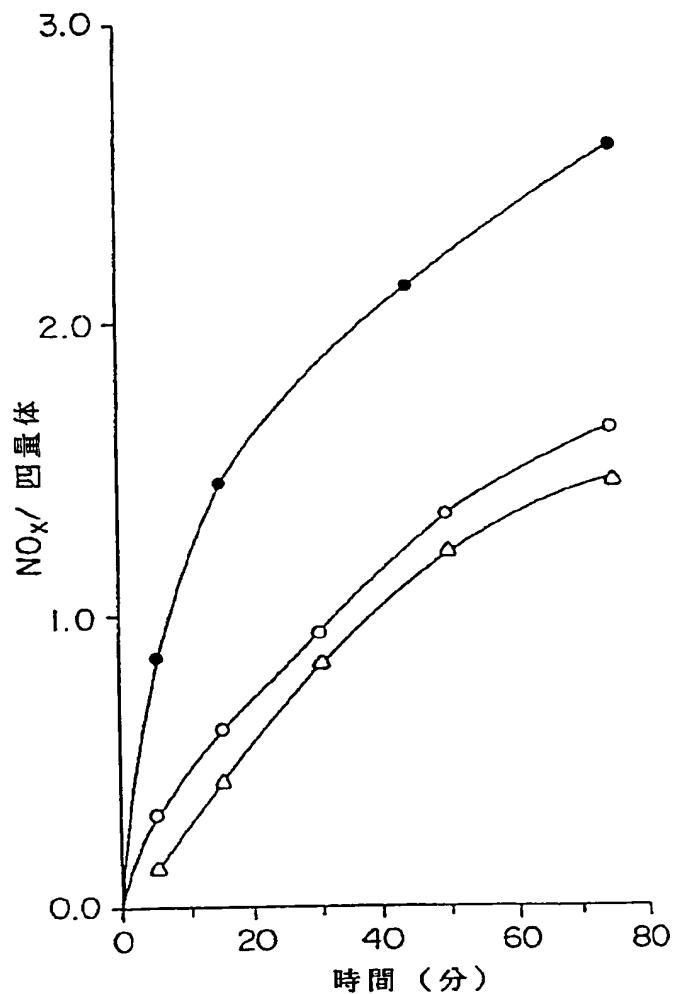


FIG. 9E

[図10]

21%O₂で呼吸しているラットへのSNO-Hb注入後
ラット尾状核被殻における血流量の変化

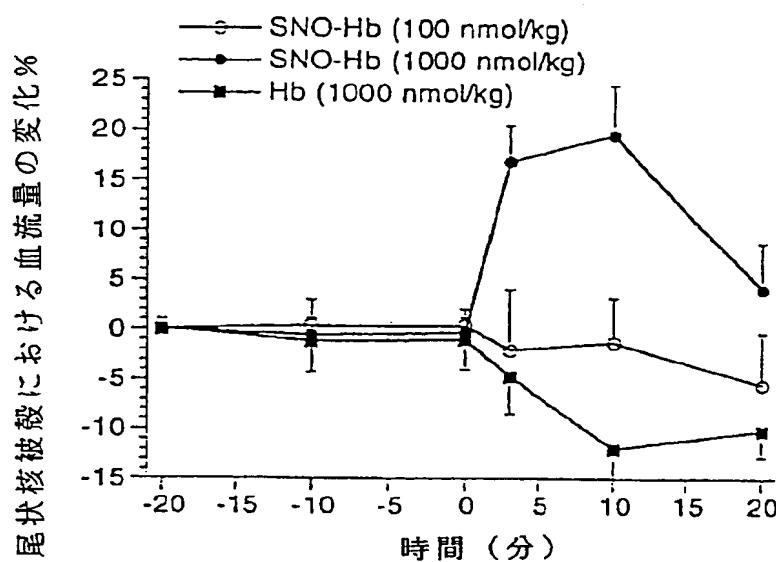


FIG. 10

[図11]

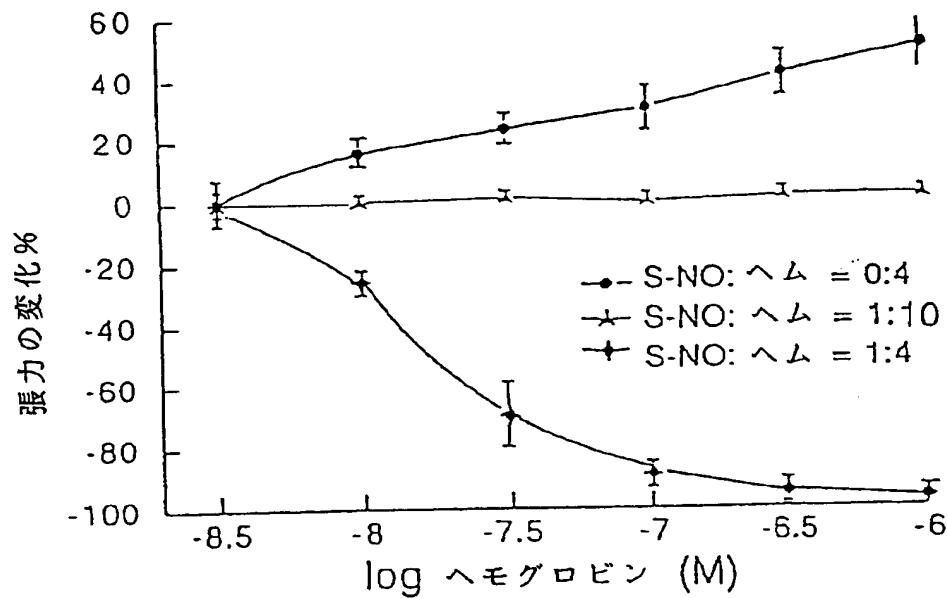


FIG. 11

【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】1997年9月17日

【補正内容】

23. SNO-Hb [Fe II] O₂を含有してなる溶液に器官を保存する工程を含む、切り取った器官の保存を向上させる方法。

24. SNO-Hb [Fe II] O₂を含有してなる調製物をヒトに投与する工程を含む、錐状赤血球貧血を有するヒトの治療方法。

25. 該調製物がSNO-Hb [Fe II] O₂およびチオールを含有してなる請求項24記載の方法。

26. 該調製物がSNO-Hb [Fe II] O₂およびS-ニトロソチオールを含有してなる請求項24記載の方法。

27. ニトロソ化ヘモグロビンを含有してなる有効量の調製物を患者に投与する工程を含む、一酸化窒素代謝および酸素代謝の異常により特徴付けられる疾患または医学的状態を有する患者の治療方法。

28. 該疾患または医学的状態が心臓疾患、肺疾患、錐状赤血球貧血、発作、敗血症または臓器移植からなる群より選ばれる請求項27記載の方法。

29. ヘムFeがFe II状態であるニトロソ化ヘモグロビンまたはニトロ化ヘモグロビンを含有してなる代用血液。

30. ニトロソ化ヘモグロビンまたはニトロ化ヘモグロビンを含有してなる組成物の治療上有効量を投与する工程を含む、動物またはヒトにおける血小板活性化または血小板粘着から生じる障害の治療方法。

31. 該障害が心筋梗塞、肺血栓塞栓症、大脳血栓塞栓症、血栓静脈炎、敗血症および不安定アンギナからなる群より選ばれる請求項30記載の方法。

32. ニトロソ化ヘモグロビンを含有してなる組成物の治療上有効量を投与する工程を含む、動物またはヒトにおける血栓形成の阻止方法。

33. ヘモグロビンのアロステリック平衡またはスピニ状態をコントロールする物質を含有してなる組成物を、治療上有効量で投与する工程を含む、動物またはヒトにおける血小板活性化の制御方法。

34. 該物質がヘモグロビンのアロステリック状態をR構造からT構造へ変換する請求項33記載の方法。

35. 水溶液中でヘモグロビンをヘモグロビン四量体に対して過剰のS-ニトロソチオールと混合し(combining)、得られた混合物(combination)をニトロソ化がヘモグロビン上の複数の部位で起きるのに適した条件下で維持する工程を含む、ポリニトロソ化SNO-ヘモグロビンの生成方法。

36. ヘモグロビンをNO供与化合物と混合し、得られた混合物をニトロソ化またはニトロ化が起きるのに適した条件下で維持し、それによってポリニトロソ化SNO-ヘモグロビンまたはポリニトロ化SNO-ヘモグロビンを生成し、選択的にFeIIIをFeIIに還元する試薬と該ポリニトロソ化SNO-ヘモグロビンまたはポリニトロ化SNO-ヘモグロビンを反応させる工程を含む、ヘムFeがFeII状態であるポリニトロソ化SNO-ヘモグロビンまたはポリニトロ化SNO-ヘモグロビンの生成方法。

37. 選択的にFeIIIをFeIIに還元する試薬がシアノボロヒドリドである請求項36記載の方法。

38. 選択的にFeIIIをFeIIに還元する試薬がメトヘモグロビンリダクターゼである請求項36記載の方法。

39. ポリニトロソ化SNO-ヘモグロビンを含有してなる組成物。

40. 酸素の非存在下、pH7.4で過剰のS-ニトロソグルタチオンをHb[FeII]とインキュベートする工程を含む、チオール基で特異的にS-ニトロシル化されるSNO-Hb[FeII]の製造方法。

41. 酸素の存在下、pH7.4で過剰のS-ニトロソグルタチオンをHb[FeII]O₂とインキュベートする工程を含む、チオール基で特異的にS-ニトロシル化されるSNO-Hb[FeII]O₂の製造方法。

42. 酸素の非存在下、pH7.4で過剰のS-ニトロソシスティンをHb[FeII]とインキュベートする工程を含む、チオール基で特異的にS-ニトロシル化されるSNO-Hb[FeII]の製造方法。

43. 酸素の存在下、pH7.4で過剰のS-ニトロソシスティンをHb[Fe

II) O_2 とインキュベートする工程を含む、チオール基で特異的にS-ニトロシル化されるSNO-Hb [Fe II] O_2 の製造方法。

4 4. 酸素の非存在下、2%ほう酸塩中pH7.4~9.2で過剰のS-ニトロ

ソシステインをHb [Fe II] とインキュベートする工程を含む、チオール基で特異的にS-ニトロシル化されるSNO-Hb [Fe II] の製造方法。

4 5. 酸素の存在下、2%ほう酸塩中pH7.4~9.2で過剰のS-ニトロソシステインをHb [Fe II] O_2 とインキュベートする工程を含む、チオール基で特異的にS-ニトロシル化されるSNO-Hb [Fe II] O_2 の製造方法。

4 6. ニトロソ化SNO-Hb (Fe II) O_2 またはニトロ化SNO-Hb (Fe II) O_2 を含有してなる代用血液。

4 7. ニトロソ化SNO-Hb (Fe II) またはニトロ化SNO-Hb (Fe II) を含有してなる代用血液。

[国際調査報告]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 96/14659

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07K14/00 A61K38/00 A61K31/04 A61K38/42 A61K31/095				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07K A61K				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages			Relevant to claim No.
X	WO,A,93 09806 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL) 27 May 1993 see the whole document --- WO,A,93 12068 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL) 24 June 1993 see the whole document --- -/-/			1,2,4,5, 7-9, 20-22, 30,32,33 1,2,4,7, 8,10-14, 20-23, 28,30-34
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed				
Date of the actual completion of the international search 23 January 1997		Date of mailing of the international search report 21.02.97		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5812 Patentzaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer A. Jakobs		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 96/14659

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Classification of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AM. J. PHYSIOL., vol. 266, no. 5, 1994, pages 1400-1405, XP000615617 KOSAKA, H. ET AL.: "ESR spectral transition by arteriovenous cycle in nitric oxide hemoglobin of citokine-treated rats" see the whole document ---	1,2,16
X	TOXICOL. APPL. PHARMACOL., vol. 94, no. 3, 1988, pages 458-465, XP002022225 KRUSZYNA, R. ET AL.: "Generation of Valency hybrids and Nitrosylated Species of Hemoglobin in Mice by Nitric Oxide Vasodilators" see the whole document ---	1,7,17, 20,36
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 259, no. 1, 1984, pages 80-87, XP002022226 DOYLE ET AL.: "Structural Effects in Alkyl Nitrite Oxidation of Human Hemoglobin" see the whole document ---	2,10-14
X	ARCHIVES OF SURGERY, vol. 129, no. 2, 1994, pages 158-164, XP000615627 SHAH, N.S. ET AL.: "Efficacy of Inhaled Nitric Oxide in a Porcine Model of Adult Respiratory Distress Syndrome" see the whole document ---	1,7-9
X	EUROPEAN HEART JOURNAL, vol. 12, no. Suppl. E, 1991, pages 16-24, XP000615639 KUKOVETZ, W.R. ET AL.: "Cellular mechanism of action of therapeutic nitric oxide donors" see the whole document ---	1,7-9
X	ARTIF. CELLS, BLOOD SUBSTITUTES, IMMOBILIZATION BIOTECHNOL., vol. 23, no. 3, 1995, pages 271-276, XP000615495 GREENBURG, A.G. ET AL.: "Nitrosyl Hemoglobin formation in-vivo after intravenous administration of a hemoglobin-based oxygen carrier in endotoxemic rats." see the whole document ---	1,7,9, 16,17
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 96/14659

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ANAL. BIOCHEM., vol. 191, no. 1, 1990, pages 138-143, XP000616299 CLANCY ET AL.: "Use of Thionitrobenzoic Acid to Characterize the Stability of Nitric Oxide in Aqueous Solutions and in Porcine Aortic Endothelial Cell Suspensions." see the whole document ---</p>	3,33
A	<p>BLOOD, vol. 47, no. 3, 1976, pages 481-488, XP000615579 CHARACHE, S. ET AL.: "Evaluation of Extracorporeal Alkylation of Red Cells as a Potential Treatment for Sickle Cell Anemia" see the whole document ---</p>	28
A	<p>BIOCHEM, BIOPHYS. RES. COMM., vol. 54, no. 3, 1973, pages 1024-1029, XP000615619 WHEELER, G.P. ET AL.: "Anti-sickling activity of nitrosoureas" see the whole document -----</p>	1,7,9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 96/14659

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although claim(s) 1-9, 16-22, 24-28, 30-34 is(are) directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: 33-34 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
Claims 33 and 34 were searched as relating to nitrosated thiol compounds in order to avoid lack of unity objections.
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 96/14659

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9309806	27-05-93	AU-A-	3071592	15-06-93
		CA-A-	2125037	27-05-93
		EP-A-	0676964	18-10-95
		US-A-	5593876	14-01-97
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9312068	24-06-93	US-A-	5380758	10-01-95
		AU-A-	1685292	02-11-92
		AU-A-	3237193	19-07-93
		AU-A-	5459096	01-08-96
		CA-A-	2107219	30-09-92
		EP-A-	0582631	16-02-94
		JP-T-	6506222	14-07-94
		WO-A-	9217445	15-10-92
		US-A-	5574068	12-11-96
-----	-----	-----	-----	-----

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁶ 識別記号 F I
 A 61 K 31/00 6 3 3 A 61 K 31/00 6 3 3 F
 6 3 9 6 3 9 C
 31/10 31/10
 35/14 35/14 Z
 38/16 C 07 K 14/805
// C 07 K 14/805 A 61 K 37/14

(31) 優先権主張番号 08/667, 003
(32) 優先日 1996年6月20日
(33) 優先権主張国 米国(US)
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L
U, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF
, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE,
SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, S
Z, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD
, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ
, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN,
CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, G
E, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR
, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, P
L, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK
, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ,
VN

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)